

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A REAKTÍV OXIGÉN SZÁRMAZÉKOK SZEREPE A POLLEN ÁLTAL
KIVÁLTOTT ALLERGIÁS REAKCIÓK KIALAKULÁSÁBAN

DR. BÁCSI ATTILA



DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
IMMUNOLÓGIAI INTÉZET

DEBRECEN

2016

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	6
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. A reaktív oxigén származékok (ROS) és az antioxidáns védekező rendszer	7
2.2. A makromolekulák oxidatív módosulásai.....	9
2.3. Az oxidatív stressz és a légúti gyulladás kapcsolata	12
2.4. Dendritikus sejt (DC) altípusok a légutakban.....	14
2.5. A DC-k szerepe a légúti allergiás betegségekben	16
2.6. A pollen eredetű adjuvánsok szerepe a DC aktivációban.....	19
2.7. A plazmacitoid DC-k jellemzői.....	20
2.8. A plazmacitoid DC-k szerepe az allergiás válaszokban.....	22
3. CÉLKITŰZÉSEK	25
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	26
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	33
5.1. A pollen NADPH oxidázok által termelt szabadgyökök hozzájárulnak az allergiás légúti gyulladás kialakulásához	33
5.2. A pollen eredetű oxidatív stressz hatása az azonnali túlérzékenységi reakciókra és a késői fázisú gyulladásos válaszra az allergiás kötőhártya-gyulladás egér modelljében.....	44
5.3. A szubpollen partikulákban jelen vannak az allergén proteinek és a NAD(P)H oxidázok is.....	52
5.4. A pollen NAD(P)H oxidázok által termelt szabadgyökök hatástalanítása lokálisan alkalmazott antioxidánsokkal gátolja az allergiás légúti gyulladás kialakulását.....	59
5.5 A laktoferrin csökkenti a pollen által indukált allergiás légúti gyulladás mértékét kísérletes állatmodellben	68
5.6. A már korábban kialakult mitokondriális működési zavar a légúti hámban súlyosbítja az allergiás gyulladást.....	73
5.7. A 8-oxoguanin DNS glikoziláz kifejeződésének gátlása a légúti hámban csökkenti az allergiás gyulladás mértékét a tüdőben.....	85
5.8. A pollen eredetű oxidatív stressz befolyásolja a veleszületett és a szerzett immunválaszokat is a dendritikus sejtek működésének megváltoztatásával	94

5.9. Parlagfű szubpollen partikulák NAD(P)H oxidázai által termelt ROS hatásainak vizsgálata humán monocita eredetű DC-ken.....	106
5.10. Oxidatív stressz hatásának vizsgálata a humán plazmacitoid dendritikus sejtekre.....	115
5.11. A natív és az oxidatíván módosított extracelluláris mitokondriális DNS hatása a humán plazmacitoid dendritikus sejtek működésére	125
6. Következtetések, hasznosíthatóság	133
7. Köszönetnyilvánítás.....	135
8. Saját közlemények, tudományos adatok.....	136
8.1. Az értekezést megalapozó <i>in extenso</i> közlemények (tematikus sorrendben)	136
8.2. Idegennyelvű közlemények a PhD fokozat megszerzése előtt	137
8.3. A PhD fokozat megszerzése óta megjelent további idegennyelvű közlemények	139
8.4. Tudományos adatok.....	144
9. Irodalmi hivatkozások	145
10. A dolgozatban tárgyalt cikkek másolatai	161

A FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

	Angol	Magyar
3-NPA	3-Nitropropionic acid	3-Nitro-propionsav
4-HNE	4-Hydroxynonenal	4-Hidroxinonenal
AA	Ascorbic acid	Aszkorbinsav
ADMA	Asymmetric dimethylarginine	Aszimmetrikus dimetil-arginin
APC	Antigen presenting cell	Antigén-prezentáló sejt
ASO	Antisense oligonucleotides	Antiszensz oligonukleotidok
AU	Arbitrary unit	Tetszőleges egység
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid	Bronhoalveoláris mosófolyadék
BDCA	Blood dendritic cell antigen	Vér dendritikus sejt antigén
cDC	Conventional dendritic cell	Konvencionális dendritikus sejt
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester	Karboxifluoreszcein szukcinimidil észter
DC	Dendritic cell	Dendritikus sejt
DCF	Dichlorofluorescein	Diklorofluoreszcein
DFO	Deferoxamine	Deferoxamin
DNPH	4-Dinitrophenylhydrazine	4-Dinitrofenilhidrazin
DNP	4-Dinitrophenyl	4-Dinitrofenil
DPI	Diphenylene iodonium	Difenilén-jodónium
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Enzim-kötött immunszorbens esszé
ELISPOT	Enzyme-linked immunosorbent SPOT	Enzim-kötött immunszorbens SPOT
FIt3L	Fms-like tyrosine kinase-3 ligand	Fms-szerű tirozin kináz-3 ligandum
GO	Glucose oxidase	Glükóz oxidáz
GSH	Glutathione	Glutation
GSSG	Oxidized glutathione	Oxidált glutation
HDM	House dust mite	Házi poratka
H ₂ DCF-DA	2',7'-dihydro-dichlorofluorescein diacetate	2',7'-dihidro-diklorofluoreszcein diacetát
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide	Hidrogén peroxid
ICOS-L	Inducible costimulatory-ligand	Indukálható kostimulatórikus-ligand
IFM	Iron-free medium	Vasmentes médium
IFN	Interferon	Interferon
IL	Interleukin	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factor	Interferon regulatórikus faktor
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopoliszacharid
MDA	Malondialdehyde	Malondialdehyd
MHC	Major histocompatibility complex	Fő hisztokompatibilitási komplex
NAC	N-acetyl-cysteine	N-acetil-cisztein
NBT	Nitroblue tetrazolium	Nitroblue tetrazólium
NF-κB	Nuclear factor-kappaB	Nukleáris faktor kappaB
NLR	Nod-like receptor	Nod-szerű receptor
O ₂ ^{•-}	Superoxide anion	Szuperoxid anion
•OH	Hydroxyl radical	Hidroxil-gyök
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns	Patogén-asszociált molekuláris mintázat
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	Poliakrilamid gélelektroforézis
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells	Perifériás vér mononukleáris sejtek
PBS	Phosphate-buffered saline	Foszfát pufferelt sóoldat

pDC	Plasmacytoid dendritic cell	Plazmacitoid dendritikus sejt
QA	Quinacrine	Quinankrin
PRR	Pattern recognition receptor	Mintázatfelismerő receptor
RLH	RIG-like helicase	RIG-szerű helikáz
ROS	Reactive oxygen species	Reaktív oxigén származékok
RWE	Ragweed pollen extract	Parlagfű pollen kivonat
SSB	Single-strand break	Egyszálú DNS törés
SLE	Systemic lupus erythematosus	Szisztémás lupus erythematosus
SOD	Superoxide dismutase	Szuperoxid dizmutáz
SPP	Subpollen particle	Szubpollen partikula
TGF- β	Transforming growth factor - β	Transzformáló növekedési faktor- β
Th	Helper T cell	Segítő T-sejt
Tfh	Follicular helper T cell	Follikuláris segítő T-sejt
TLR	Toll-like receptor	Toll-szerű receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor- α	Tumor nekrosis faktor- α
TOC	Tocopherol	Tokoferol
Treg	Regulatory T cell	Regulatórikus T-sejt
X+XO	Xanthine + xanthine oxidase	Xantin + xantin oxidáz

1. BEVEZETÉS

Az allergiás betegségek előfordulása az elmúlt évtizedekben drámai módon megnövekedett. Az allergiás rhinitis prevalenciájának országos átlagát évről-évre egyre magasabbra becsülik, napjainkban már 15-25% között is lehet. Sajnálatos módon a betegek legkevesebb harmadánál asztma is diagnosztizálható. Az allergiás kórképek és ezen belül a parlagfű pollen okozta megbetegedések számának ugrásszerű megemelkedését többféle tényező okozhatja, kiemelt szerepe van azonban a megváltozott nagyvárosi életformának valamint a civilizációs környezeti változásoknak. Habár az életveszélyes anafilaxiás reakciók mellett az asztma is lehet halálos kimenetelű, az allergia többnyire nem végzetes betegség, viszont jelentősen rontja az életminőséget. Az allergiás reakciók során kialakuló kellemetlen tünetek világszerte milliók számára okoznak szenvedést és átvirrasztott éjszakákat. Ezért lenne nagy jelentőségű, ha az allergiás reakciók pathomechanizmusát minél jobban megismerhetnénk, és olyan eljárásokat fejleszthetnénk ki, amelyekkel megelőzhetnénk az allergiás reakciók kialakulását, vagy megszüntethetnénk az emberi szervezet kóros válaszadó készségét.

Az allergiás légúti gyulladás kialakulása szoros összefüggésben van az oxidatív stresszel. Oxidatív stressz akkor jön létre, ha több szabadgyök termelődik, mint amennyit a sejtek, szövetek antioxidáns kapacitása eliminálni képes. A légutakban az oxidatív stressz kialakulásáért mind exogén, mind endogén forrásokból származó reaktív gyökök is felelősek lehetnek. Az oxidatív stressz számos olyan citokin és kemokin termelődését is kiváltja, amelyeknek alapvető szerepe van a gyulladásos folyamatok kialakulásában. Néhány órával az allergén bejutása után, intenzív szabadgyök-termelésre képes neutrofil és eozinofil granulociták vándorolnak a légutak peribronchiális régióiba. Másik fontos endogén forrása a reaktív gyököknek a sejtleggzés. A mitokondriális sejtleggzés során szabadgyökök keletkeznek melléktermékként. Számos tanulmány számol be arról, hogy azok a külső környezeti tényezők, amelyek fokozzák a reaktív gyökök szintjét a légutakban, mint például az ózon, a cigarettafüst, vagy a dízelmotorok kipufogófüstjének részecskéi, súlyosbítják az allergiás légúti gyulladás és az asztma tüneteit.

Az MTA doktori értekezésemben azokat a legfontosabb kísérleteket mutatom be, amelyek során a pollen által kiváltott allergiás reakciók és az oxidatív stressz egy teljesen új és meglepő kapcsolatát sikerült feltárnunk.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

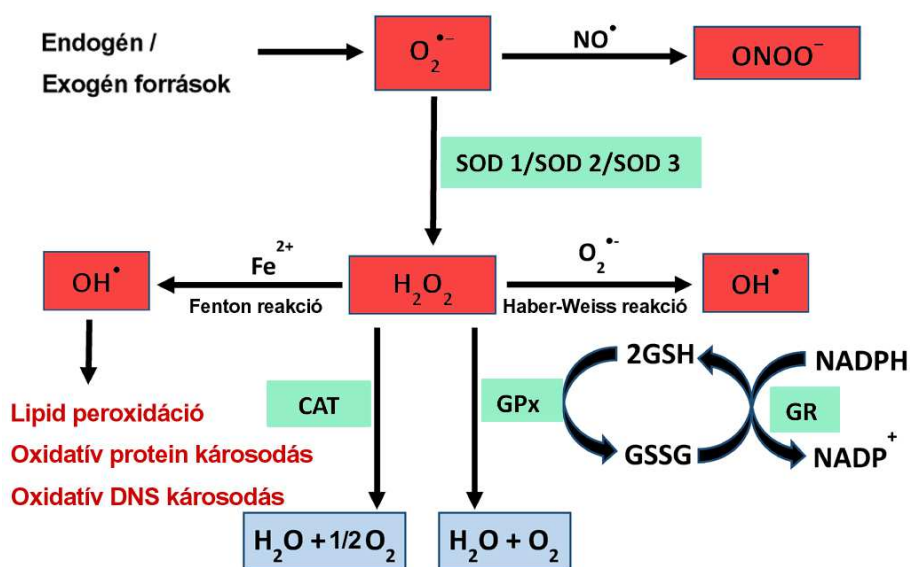
2.1. A reaktív oxigén származékok (ROS) és az antioxidáns védekező rendszer

A reaktív oxigén származékok molekuláris oxigénből redukcióval képződnek. Vannak közöttük olyan molekulák, amelyek külső elektronpályájukon egy párosítatlan elektront tartalmaznak, ezek a szabadgyökök. Ebbe a csoportba tartozik például a szuperoxid anion ($O_2^{\bullet-}$) és a hidroxil-gyök ($OH^{\bullet}$) is. Vannak olyan molekulák, amelyek nem rendelkeznek párosítatlan elektronnal, mégis erősen reaktívak, valamint prekursorai lehetnek szabadgyökök képződésének. Ilyen molekula például a hidrogén peroxid (H_2O_2), a szinglet oxigén (1O_2), vagy az ózon (O_3). A reaktív oxigén származékok nitrogén-oxiddal is reakcióba léphetnek, ekkor reaktív nitrogén származékok képződnek. Az egyik legfontosabb ezek közül a peroxinitrit ($ONOO^{\bullet}$), amely $O_2^{\bullet-}$ -ből és nitrogén-oxid gyökből ($NO^{\bullet}$) jön létre.

A ROS forrása lehet exogén vagy endogén. Az exogén források közé tartoznak például a dohányfüst, a dízelmotorok által kibocsátott apró részecskék, az UV és az ionizáló sugárzás, a többszörösen telítetlen zsírsavak mértéktelen fogyasztása, valamint különböző gyógyszerek, főként az antineopláziás szerek [1, 2]. Az endogén források közül a legjelentősebb a mitokondrium. A légzési láncban haladó elektronok 0,1-2%-a ugyanis „megszökik” a rendszerből, és az O_2 részleges redukcióját okozza, ami $O_2^{\bullet-}$ keletkezéséhez vezet [3]. A mitokondriumokban a ROS képződés elsődleges helyszínei a légzési lánc I. és III. komplexei [4]. A mitokondriumok ROS termelése főleg akkor fokozódik, amikor valamilyen hatás miatt gátlódik a légzési lánc működése [5]. A létrejövő $O_2^{\bullet-}$ spontán dizmutációval, vagy a mitokondriumokban magas koncentrációban megtalálható szuperoxid dizmutáz (SOD) enzimek működése révén H_2O_2 -dá alakul [6], ami a mitokondriális membránon könnyen átdiffundálva a citoszólba kerül [7]. Bár a mitokondriális $O_2^{\bullet-}$ termelés a sejtlégzés melléktermékének tűnik, azonban a sejt működésének szabályozásában is szerepet játszik. Hipoxiás körülmények között például, a fokozott ROS termelés nélkülözhetetlen a hipoxia-indukálható transzkripciós faktor aktiválásához, ami a megfelelő celluláris válaszok elindításához szükséges [8]. A sejtekben zajló szabályozott ROS termelésért a főleg NADPH oxidáz (Nox) enzimek a felelősek [9]. Ezeket az enzimeket legelőször a fagocita sejtekben (makrofágok, neutrofil granulociták) írták le, és az általuk termelt $O_2^{\bullet-}$ kulcsszerepet játszik a kórokozók elpusztításában [10, 11]. Az elmúlt években különféle szövetekben több, a fagocita oxidázzal homológ enzimet is felfedeztek. Ezeket ma már a NADPH oxidázok Nox enzimsaládjának tagjaiként tartjuk számon [12, 13]. Szuperoxid gyököket nemcsak NADPH oxidázok, hanem más enzimek is, például xantin oxidáz, lipoxigenáz, ciklooxygenáz, citokróm P-450 enzimek képesek termelni [14].

Vannak olyan ROS termelő mechanizmusok is, amelyek közvetlenül H_2O_2 szintézisét eredményezik. A peroxisómák a sejtek H_2O_2 termelésének legfontosabb forrásai [3]. Ezek a sejtorganellek számos olyan enzimet tartalmaznak, amelyek működésük révén H_2O_2 -ot termelnek. Ezek közé tartoznak például a glikol oxidáz, D-aminosav oxidáz, ureát oxidáz, acetil-CoA oxidáz. A peroxisómák enzimatis oxidatív reakciói különösen fontosak a máj-, valamint a lépsejtekben, ahol a toxikus anyagok eliminálása létfontosságú a szervezet számára [15].

A ROS szintjét a szervezetben nemcsak a keletkezésük, hanem lebontásuk sebessége is szabályozza. A mitokondriumokban nem enzimatis úton keletkező, vagy a különböző enzimek által termelt $\text{O}_2^{\bullet-}$ átalakítását H_2O_2 -dá a SOD enzimek végzik (1. ábra). A SOD enzimeknek három típusát különböztetjük meg az enzim aktív részéhez kapcsolódó fém jellege és a celluláris lokalizációjuk alapján [16]. A réz és cink tartalmú SOD (CuZn-SOD vagy SOD1) a sejtek citoszoljában, a mangán tartalmú SOD (Mn-SOD vagy SOD2) pedig a mitokondriumok mátrixában található meg. Kis mennyiségű extracelluláris SOD (ec-SOD vagy SOD3) is van a szervezetünkben, amely bár a CuZn-SOD családba tartozik, de citoszolikus típusnál nagyobb molekulatömegű és heparint kötő hellyel is rendelkezik. A H_2O_2 semlegesítését a kataláz és a glutation peroxidáz enzimek is elvégezhetik (1. ábra). Az oxidált glutation (GSSG) regenerálása a NADPH-függő glutation reduktáz feladata (1. ábra) [17].



1. ábra. A reaktív oxigén származékok képződése és metabolizmusa

$\text{O}_2^{\bullet-}$: szuperoxid anion; H_2O_2 : hidrogén peroxid; ONOO^- : peroxinitrit; $\text{OH}^\bullet$: hidroxil-gyök, SOD: szuperoxid dizmutáz; CAT: kataláz; GPx: glutation peroxidáz; GR: glutation reduktáz; GSH: redukált glutation; GSSG: oxidált glutation [18].

A ROS hatástalanításában nemcsak enzimek által katalizált mechanizmusok vesznek részt, hanem különböző antioxidáns hatású kismolekulák is. Ezek a sejten belül, illetve a sejtek közötti térben antioxidáns tulajdonságaik révén képesek lelassítani vagy meggátolni más molekulák oxidációját, azáltal hogy megakadályozzák az oxidatív láncreakciókat és eliminálják a reaktív gyököket. Az antioxidánsok lehetnek vízben oldódó vagy zsírban oldódó molekulák. Vízben oldódó antioxidánsok például a redukált glutation (GSH), a tiolok (cisztein), az aszkorbinsav (AA), a húgysav, a melatonin és az N-acetil-cisztein (NAC). A NAC egy kettős hatású antioxidáns, egyrészt a glutation prekursoraként képes fokozni a sejtek antioxidáns kapacitását, másrészt közvetlenül is képes reakcióba lépni a reaktív gyökökkel és semlegesíteni azokat [19]. A zsírolékony antioxidánsok közé tartozik az α -tokoferol (E-vitamin), az ubiquinolok és a karotinoidok. A vízben oldódó antioxidánsok a citoplazmában és a vérben lévő szabadgyököket semlegesítik, míg a zsírolékonyak a membránokat védik a lipidperoxidációtól [20]. A sejtek oxidatív állapotát elsősorban a reaktív gyökök és az antioxidánsok sejten belüli aránya határozza meg.

2.2. A makromolekulák oxidatív módosulásai

Ha a homeosztázis a ROS termelése vagy kialakulása és az antioxidáns rendszerek között megbomlik, azaz a redox állapot az oxidáció irányába tolódik el, oxidatív stressz alakul ki. Oxidatív stressz során a sejtek és szövetek makromolekulái károsodhatnak. Leggyakrabban a lipidek, a fehérjék és a DNS molekulák oxidációja következik be [21]. Az oxidált termékek mennyisége jelzi, hogy milyen mértékben borult fel az egyensúly az oxidációs és az antioxidáns, valamint a károsodott molekulákat javító rendszerek között.

A sejtalkotó komponensek közül a sejtmembrán az egyik legérzékenyebb a ROS káros hatásaival szemben. A telítetlen zsírsavak a szabadgyökök közül különösen a $\text{OH}^\bullet$ támadásának vannak kitéve. A reakció első lépéseként a szabadgyök $\text{H}^\bullet$ -t von el a telítetlen zsírsavtól. A kialakuló lipid-gyök nagyon reaktív, lipid peroxil-gyök forrása lehet, amely telítetlen zsírsavakkal reagálva lipidperoxidokat vagy ciklikus szerkezetű peroxidokat képez. A lipidperoxidáció a sejtmembrán fluiditásának és permeabilitásának megváltozását eredményezheti, akár a lipid kettősréteg integritása is megszűnhet. A lipidek oxidatív módosulása során nemcsak lipidperoxidok, hanem aldehidek is keletkeznek (pl. malondialdehid /MDA/ és 4-hidroxinonenal /4-HNE/) [22, 23]. Ezek az aldehidek, noha nem szabadgyökök, mégis rendelkeznek bizonyos reaktivitással. Képesek reakcióba lépni a lizinek ϵ -aminocsoportjával, így a fehérjék között keresztkötéseket alakíthatnak ki [24]. Relatív stabilitásuk révén az aldehidek a keringési rendszeren keresztül eljuthatnak a

keletkezésük helyétől távol eső szövetekbe is, és ott is súlyos károsodásokat okozhatnak [25, 26].

A sejtekben zajló folyamatok többsége fehérjék közvetítésével valósul meg, ezért ezek a makromolekulák nagy mennyiségben fordulnak elő a biológiai rendszerekben, így fontos célpontjai a ROS támadásának. A fehérjék oxidatív módosulása magába foglalhatja a polipeptid „gerincnek” az oxidálódását, fehérje-fehérje keresztkötések kialakulását, az aminosav oldalláncok oxidációját, valamint reaktív karbonil-származékok keletkezését is. Ezek a folyamatok a fehérje fragmentációját eredményezhetik, illetve különféle fehérje oxidációs termékek keletkezhetnek, amelyek más makromolekulák károsodását okozhatják [27]. Elvileg a fehérjék minden aminosav oldallancát érheti szabadgyök támadás, azonban a tiol-csoporttal rendelkező cisztein a leginkább fogékony erre. Habár kisebb mértékben, mint a cisztein, a kéntartalmú metionin és az aromás aminosavak, a tirozin és a triptofán is hajlamosak az oxidációra [28]. Az oxidatív módosulás jelentős változásokat eredményezhet a fehérje szerkezetében [23]. A legtöbb fehérje károsodás helyrehozhatatlan, ezért az oxidatív változásoknak nagyon széles körű funkcionális következményei lehetnek. Megváltozhat receptorok, enzimek és transzport fehérjék működése, valamint új antigén epitópok jöhetnek létre, amelyek immunválaszokat indukálhatnak [29]. Bár az oxidatív módon módosult fehérjéket általában lebontják a proteaszómák, vagy autofágiát követően a lizoszómák, előfordulhat, hogy a károsodott fehérjék eltávolítása nem teljes mértékű, ami funkcionálisan inaktív protein aggregátumok kialakulásához vezethet. Ezek az életkor előrehaladtával a sejtek különböző kompartmentjeiben, vagy az extracelluláris térben felhalmozódhatnak [28]. Az is lehetséges, hogy az oxidatív stressz magát az oxidált fehérjék eltávolításáért felelős proteolitikus rendszert károsítja, ezáltal felgyorsítja a karbonilált fehérjékből álló aggregátumok felhalmozódását [30]. Az ilyen fehérje-aggregátumok fokozott képződését összefüggésbe hozták több időskori betegség (pl. Parkinson-kór és Alzheimer-kór), sőt egyes tumorok kialakulásával is [18, 31].

A különböző szabadgyökök és reaktív származékaik több, mint százféle oxidatív DNS károsodást okozhatnak, például egyes vagy kettős szálú töréseket (single-strand break /SSB/, double-strand break /DSB/), dezoxiribóz oxidációt, DNS-fehérje keresztkötések kialakulását, valamint bázis módosulásokat. A DNS bázisok között a guanin oxidálódik a legkönnyebben, ugyanis annak a legalacsonyabb a redox potenciálja a négyféle bázis közül (-1.29 mV vs. Ni-H elektród). A guanin bázis oxidatív károsodása többféle léziót eredményezhet - az oxidáló ágensek tulajdonságaitól függően -, a leggyakoribb elváltozás mégis a 7,8-dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG) kialakulása [32]. Becslések szerint élettani körülmények között körülbelül százezer 8-oxoG keletkezik az eukarióta sejtek DNS-ében naponta [33]. Az emberi sejtekben az intrahelikális 8-oxoG egyedi elektromos tulajdonságait a 8-oxoguanin DNS-glikoziláz 1 (OGG1) enzim ismeri fel, és távolítja el a 8-oxoG-t a

nukleáris és a mitokondriális genomból [34]. A DNS-ből kivágódó 8-oxoG bázisról korábban azt gondolták, hogy nincs biológiai hatása, és egyszerűen távozik a sejtekből, illetve szövetekből [35]. A 8-oxoG kimutatása az extracelluláris folyadékból az egyik legmegbízhatóbb módszer a szervezetben kialakult oxidatív stressz mértékének becslésére [36]. Ha nem történik javítás, a 8-oxoG az adeninnel kerül párba a DNS-replikáció során és ez transzverziós mutációt (G:C→T:A) eredményezhet. Az *Ogg1*^{-/-} egerek a genomban felhalmozódó 8-oxoG ellenére sem mutatnak lényegesebb fenotípusos eltérést, vagy fokozott hajlamot a tumorok kialakulására, még akkor sem, ha krónikus oxidatív stressznek voltak kitéve [37]. Meglepő módon az *Ogg1*^{-/-} egerek ellenállóbbak a *H. pylori* fertőzés keltette gyulladással [38], továbbá lipopoliszacharid (LPS) vagy oxazonon kezelés által kiváltott gyulladással szemben [39], ami arra utal, hogy az OGG1-nek (a DNS-javító mechanizmusoktól függetlenül), és/vagy a szabad 8-oxoG-nak szerepe van a gyulladások kialakulásában. Nemrégiben kiderült, hogy az OGG1 nagy affinitással köti a DNS-ből kivágott 8-oxoG-t, az enzim aktív centrumától eltérő helyen [40]. A létrejövő komplex kölcsönhatásba lép a Ras [40], a Rac1 [41] és a RhoA [42] kis GTPázokkal, és elősegíti a megkötött GDP lecserélődését GTP-re. A 8-oxoG-OGG1 komplex hatására létrejövő aktiválódása a kis GTPázoknak olyan gének átíródását indukálhatja, amelyek jelentős szerepet játszanak a légúti gyulladások kialakulásában és a tüdő szöveti átépülésében (remodeling) [43].

Korábban azt gondolták, hogy a különböző molekulák oxidatív módosulásai mindenképpen az adott molekula irreverzibilis károsodásához, valamint funkcióvesztéséhez vezetnek. Az elmúlt néhány évtized kutatásai alapján azonban egyértelművé vált, hogy az oxidatív módosulás gyakran fiziológias folyamat része [44]. A fehérjék szabályozott körülmények között történő módosítása elsősorban a H₂O₂-ra jellemző. A H₂O₂ ugyanis a hidroxil gyökhöz, vagy a szuperoxid anionhoz viszonyítva kevésbé reaktív, így alacsonyabb koncentrációban kisebb valószínűséggel lép nem-specifikus reakciókba. Ráadásul a féléletideje is hosszabb, mint a szabadgyököké, így képződési helyétől viszonylag nagyobb távolságra is el tud diffundálni. Hatását általában a fehérjék cisztein oldalláncainak szabad tiol-csoportján fejt ki. Az oxidálódás eredményeként a fehérjén belül, vagy a fehérje molekulák között diszulfid hidak alakulhatnak ki. A H₂O₂ főleg kináz-mediált útvonalak szabályozásában vesz részt, a legjobban jellemzett *in vivo* célpontjai a protein tirozin foszfatázok (pl. PTP-1B, SHP1 és SHP2) [45]. Jelátviteli szerepének fontosságát sokféle celluláris folyamatban, például a proliferációban, a migrációban, az adhézió-hiány okozta sejthalálban, és a redoxhomeosztázis szabályozásában is leírták már [46].

2.3. Az oxidatív stressz és a légúti gyulladás kapcsolata

A szabadgyökök átlagos élettartamát számos tényező befolyásolhatja, például az oxigén tenzió, a hőmérséklet vagy más szabadgyökök illetve antioxidánsok jelenléte. Fiziológias körülmények között, a sejtekben illetve a szövetekben, ahol az oxigén koncentráció jóval alacsonyabb (kb. 10-25 μM), mint *in vitro* körülmények között a levegőben (kb. 220 μM), a reaktív gyökök élettartama sokkal hosszabb lehet [47]. Így az *in vivo* körülmények között keletkező szabadgyökök és más oxigén származékok élettartama akár 1-2 nagyságrenddel is hosszabb lehet, mint *in vitro* kísérletek esetében. Ez lehetővé teszi, hogy a reaktív gyökök a sejtek szignalizációs és regulációs folyamatainak résztvevőivé váljanak [48, 49], vagy nagyobb koncentráció esetén részt vegyenek az öregedési folyamatokban és különböző betegségek patomechanizmusában [2].

Régóta ismert, hogy az allergiás légúti gyulladás és az asztma kialakulásában is szerepet játszik az oxidatív stressz [50]. Talán az egyik legjobban ismert forrásai a légúti oxidatív stressznek a különböző kiváltó tényezők hatására beáramló gyulladásos sejtek. Az infiltrálódó, aktivált gyulladásos sejtek, elsősorban NADPH oxidázaik révén, nagy mennyiségű $\text{O}_2^{\bullet-}$ -t termelnek. A mechanikai és környezeti ingerek hatására a hámsejtekben kialakuló mitokondriális működési zavar szintén fokozott $\text{O}_2^{\bullet-}$ termelődést eredményezhet, így hozzájárulhat a légúti oxidatív stressz kialakulásához [51]. A $\text{O}_2^{\bullet-}$, a már ismert mechanizmusok révén, gyorsan H_2O_2 -dá dizmutálódhat. A H_2O_2 Fe^{2+} vagy Cu^{2+} ionok jelenlétében a rendkívül reakcióképes hidroxil-gyökké alakul, vagy az eosinofil és neutrofil granulociták peroxidázainak közreműködésével, halogénnel lép kölcsönhatásba, ami hipobrómosav (HBrO) vagy hipoklórsav (HClO) kialakulásához vezet [52, 53]. Ráadásul, jelentős mennyiségű $\text{NO}^{\bullet}$ is képződik a hámsejtekben a gyulladásos folyamatok részeként indukálódó nitrogén-oxid szintáz (iNOS) működése révén. Reaktív oxigén származékok jelenlétében a $\text{NO}^{\bullet}$ különböző reaktív nitrogén származékokat hoz létre [54]. Ezek a reaktív vegyületek módosíthatják a fehérjék szerkezetét és funkcióját. A károsodott proteinek lebontásából származó kloro-, bromo-, és nitrotirozin kimutatható az asztmás betegek vizeletében [55]. A fehérjék oxidatív módosulása felerősítheti az oxidatív és a gyulladásos folyamatokat a légutakban. A nitro- és klorotirozin oldalláncok kialakulása például csökkenti a kataláz enzim aktivitását, ezáltal lehetővé teszi a H_2O_2 felhalmozódását, ami tovább növeli az oxidatív stresszt [56].

A környezeti forrásból származó oxidánsok szintén hozzájárulhatnak a légúti oxidatív stressz kialakulásához. Minden lélegzetvételnél nagyszámú oxidatív potenciállal rendelkező molekula jut be a légutakba, különböző gázok (pl. ózon, nitrogén-oxidok, kén-dioxid) [57] vagy finom, apró szemcsék formájában [58]. A csak néhány mikrométeres, vagy annál is

kisebb részecskék könnyedén elérhetik az alsó légutak, és ott elősegíthetik az oxidatív egyensúly felbomlását, ami gyulladásos citokinek felszabadulásához vezethet [59]. A gépjárművek, főleg a dízelmotor meghajtásúak, által kibocsátott füst szintén oxidatív stresszt okozhat, még rövid ideig tartó expozíció esetén is [60]. Mind az aktív, mind a passzív dohányzás során belélegzett füst egyike a legjelentősebb oxidatív stresszt indukáló forrásoknak. Úgy becsülik, hogy egyetlen szippantás során 10^{14} gáz, vagy részecske fázisú oxidáns jut be a légutakba. Nem meglepő tehát, hogy az aktív dohányosokban magas az oxidatív stressz biomarkereinek a szintje, nemcsak a légutakban, hanem szisztémásan is, mint a nemdohányzóknál [61]

Egyre több a bizonyíték arra, hogy az elhízás jelentős rizikófaktor az asztma kialakulásában. Az elhízott emberekben súlyosabbak az asztma tünetei és azok nehezebben kontrollálhatók gyógyszeresen. Egyes tanulmányok kimutatták, hogy a testtömeg-index (BMI) növekedésével, növekszik a légúti oxidatív stressz biomarkereinek szintje is [62]. A légúti oxidatív stressz kialakulására elhízott asztmás betegekben magyarázat lehet a fokozott gyulladásos válasz és a leptin közötti összefüggés. Kísérleti körülmények között ugyanis a leptin növeli a gyulladásos sejtek számát és a pro-inflammatórikus citokinek szintjét a légutakban [63]. Az elhízott asztmás betegekben nagyon magas a leptin koncentrációja a légutakban, és kimutatták azt is, hogy alveoláris makrofágjaik aktivált állapotban vannak, és gyulladáskeltő citokineket termelnek [64, 65]. Érdekes módon, magas zsírtartalmú ételek fogyasztása után légúti neutrofilia alakul ki és a neutrofil sejtek mieloperoxidáz enzimei hatására hipoklórossav képződhet [66]. Egy további, nemrégiben feltárt lehetséges kapocs a légúti oxidatív stressz és az elhízás között, a légúti iNOS enzim $O_2^{\bullet}$ termelése. Ha kevés a rendelkezésre álló szubsztrátja (L-arginin) az enzimnek és/vagy az endogén NOS inhibitorok szintje megemelkedik, ez az iNOS működésének szétválasztásához vezet. Szétválasztás során, az enzim $O_2^{\bullet}$ -t termel NO helyett [67]. Az aszimmetrikus dimetil-arginin (ADMA) L-argininből jön létre poszttranszlációs metilációval, és egyike annak a három NOS inhibitornak, amelyek a NOS mindhárom izoformáját képesek szétválasztani [68]. A súlyos asztmában szenvedőkben alacsony az L-arginin szintje [69], ugyanakkor az elhízottakban az ADMA magas koncentrációját mutatták ki [70]. A plazmában az L-arginin/ADMA koncentrációk fordítottan arányos az asztmás betegek testtömeg-indexével, és minél kisebb az L-arginin/ADMA aránya, annál nagyobb a légúti tünetek gyakorisága [71]. Továbbá, az ADMA koncentrációja magasabb az asztmás betegek légútjaiban, és a szintje fordítottan arányos a kilégzett NO mennyiségével [71]. Egérkísérletben, az állatok ADMA kezelése fokozza a légúti gyulladásos válaszokat [67]. Ezeknek a megfigyeléseknek az alapján, az L-arginin/ADMA arány fontos indikátora a légúti oxidatív stressznek és az NO csökkent termelésének.

2.4. Dendritikus sejt (DC) altípusok a légutakban

A DC-k, az immunrendszer egyéb sejtjeihez hasonlóan, a csontvelői CD34⁺ hematopoetikus őssejtekből származnak, különböző fejlődési útvonalakat követve mieloid, illetve limfoid előalakokká differenciálódhatnak, majd a perifériás szövetekben telepednek le. Az utóbbi évek kutatásai rávilágítottak arra, hogy a DC-k fejlődési folyamatai sokkal nagyobb flexibilitást mutatnak, mint korábban gondolták [72]. Legfrissebb eredmények szerint mieloid, illetve limfoid prekursorokból is keletkezhetnek DC-k, melyek fms-szerű tirozin kináz-3 (fms-like tyrosine kinase-3, FLT3) receptort expresszálnak felszínükön, amely receptor jelenléte döntően befolyásolja a DC irányba történő differenciálódást [73]. A DC altípusok esetében az adott szöveti környezet jelentősen befolyásolja azt, hogy az FLT3 receptort expresszáló mieloid vagy limfoid előalak szolgál-e a DC prekursoraként. Ugyanakkor elmondható, hogy többnyire a mieloid eredetű DC differenciáció megy végbe [74].

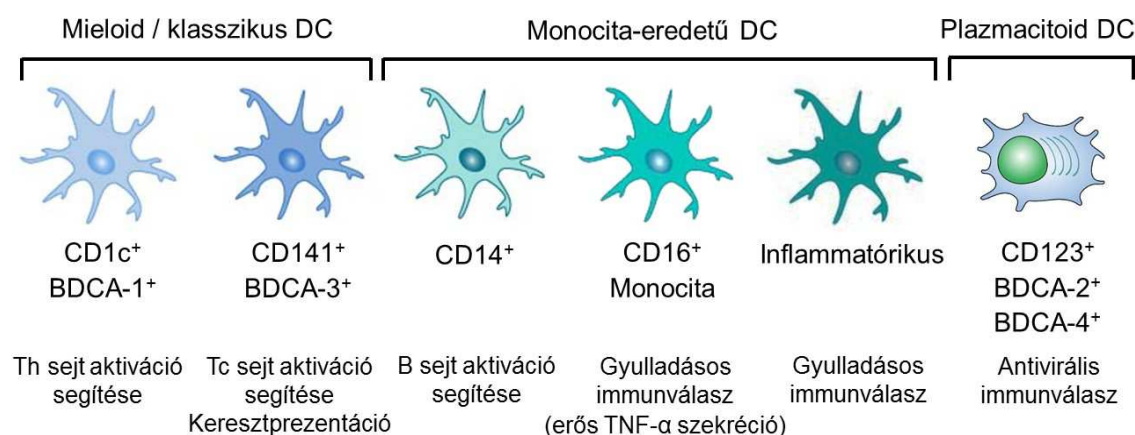
A DC-k professzionális antigén-prezentáló sejtek (APC-k), ezért meghatározó szerepük van az antigének felvételében, feldolgozásában, a T-sejteknek való bemutatásában, majd a specifikus immunválasz elindításában és szabályozásában is. A DC-k a légutakban és a tüdőben is megtalálhatók, és más sejtekkel együttműködve, kulcsszerepet játszanak a tüdő homeosztázisának fenntartása mellett a légúti allergiás betegségek patogenezisében is. Az egerek és az emberek légútjaiban *steady-state* körülmények között a DC-knek két fő populációja mutatható ki: a konvencionális DC-k (DC-k) és a plazmacitoid DC-k (pDC-k). A konvencionális DC-k nagyobb csoportot képviselnek a pDC csoporthoz képest, ezért először ezeket a sejteket mutatom be, a pDC-k jellemzőit majd külön fejezetben ismertetem. Egerekben a konvencionális csoporton belül elkülöníthetők az intraepiteliális CD103⁺ CD11b⁻ DC-k és a szubmukózában található CD103⁻ CD11b⁺ DC-k [75]. Gyulladásos válasz során egy harmadik konvencionális DC altípus is differenciálódik a tüdőben, CCR2-függő módon monociták vándorolnak a gyulladás helyére, ahol megfelelő környezeti stimulusok hatására gyulladásos, monocita eredetű DC-kké differenciálódnak. Ezekre az DC-kre a CD206, CD11b, Sirpa, CD14, CD1a és az FcεRI kifejeződése jellemző [76].

A CD103⁺ CD11b⁻ DC-k az antigén expozíciónak folyamatosan kitett, légúti mukozális felszíneken a hámsejtek bazolaterális oldalán helyezkednek el, és *tight junction* kapcsolatokat alakítanak ki velük. Ehhez *tight junction* proteinek fejeznek ki, mint például a claudin-1, claudin-7 és a zona occludens-2, amelyek „horgonyként” tartják a DC-ket az hámsejtek rétegében anélkül, hogy az epitélium integritása sérülne [77, 78]. A bélben található DC-khez hasonlóan a tüdőben található CD103⁺ CD11b⁻ DC-k is képesek dendritjeikkel „átnyúlni” a hámsejtek által alkotott barrieren keresztül és folyamatosan monitorozzák a szervezetbe bekerült anyagokat [79-81]. A CD103⁺ CD11b⁻ DC-k fontos szerepet játszanak az antigéneknek a CD8⁺ T-sejtek számára történő keresztprezentációjában [82]. Aktiválódásuk

esetén a $CD103^+ CD11b^-$ DC-k a légutakból a közeli nyirokcsomókba vándorolnak, miközben érési folyamatokon mennek keresztül, elvesztik endocitotikus képességüket, ezzel párhuzamosan nő az MHC-II és a kostimulatorikus molekulák kifejeződése a felszínükön. A nyirokcsomókban a rezidens $CD8\alpha^+$ DC-k „veszik át” a $CD103^+$ DC-ktől az antigéneket [83-85]. Mindkét sejttípus képes antigént prezentálni és aktivációs szignált biztosítani a naív $CD8^+$ T-sejtek számára [86]. Mivel a $CD103^+$ DC-k fejlődése összefüggésben áll a nyirokcsomó rezidens $CD8\alpha^+$ DC-k fejlődésével, a Batf3 transzkripciós faktor deficiens egerekben nem alakulnak ki sem a tüdő $CD103^+$ DC-k, sem a nyirokcsomó rezidens $CD8\alpha^+$ DC-k [87, 88]. Kimutatták továbbá, hogy a $CD103^+ CD11b^-$ DC-k - ellentétben a $CD11b^+$ DC-kkel - antigén expozíció után RALDH-t fejeznek ki, ezzel elősegítik a *de novo* regulatórikus T-sejt (Treg) indukciót és a légúti tolerancia kialakulását [89].

A $CD11b^+$ DC-k a légutak és a tüdő parenchymájában helyezkednek el [90, 91]. A bőrben, nyirokcsomókban és a lépben található $CD103^- CD11b^+$ DC-kkel ellentétben, a tüdőben ezek a sejtek a keresztprezentáló $CD103^+$ sejtekhez képest kisebb számban vannak jelen [92]. Korábban kimutatták, hogy a $CD11b^+$ DC-k mind fiziológiás, mind allergiás gyulladásos állapotokban nagy mennyiségű kemokint és citokint termelnek [93]. A $CD103^+$ DC-khez hasonlóan a $CD11b^+$ DC-k is képesek a légutakból a közeli nyirokcsomókba vándorolni. A $CD11b^+ CD64^-$ DC-k a házi poratka-specifikus T-sejtek Th2 irányú polarizációját váltják ki [94].

Emberben a tüdő DC-k karakterizálása és pontos funkciójának meghatározása validált markerek hiányában sokkal komplikáltabb az egér DC-khez képest. A tüdő DC-k jellemzése klinikai minták esetében köpetből vagy bronchoalveoláris mosófolyadék (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) mintákból történik. Egészséges emberek BALF mintáiban két fő DC altípust azonosítottak: a $CD11c$ -t kifejező DC-ket, valamint a $CD123$ markert expresszáló pDC-ket [95]. Ellentétben a BALF mintákkal, ahol DC-k csak kis számban vannak jelen, nagyszámú DC található a tüdő parenchymában az intraalveoláris szeptumhoz asszociálva [96, 97]. A normál humán tüdő mintákban három DC altípust azonosított: a $CD1a^+$, MHC-II⁺, BDCA1⁺ DC, a BDCA3⁺, $CD11c^+$ DC, valamint a BDCA2⁺, $CD123^+$ pDC altípusokat (**2. ábra**) [98, 99]. Ezeket a DC altípusokat karakterizálták egészséges egyének és allergiás asztmában szenvedő betegek BALF mintáiban is allergén expozíció után [100]. Egy másik tanulmányban a Langerhans típusú DC-k karakterizálása során dohányosok tüdő szövetéből egy Langerin⁺ Langerhans-típusú DC altípust és egy DC-SIGN⁺ intersticiális DC altípust azonosítottak [101].



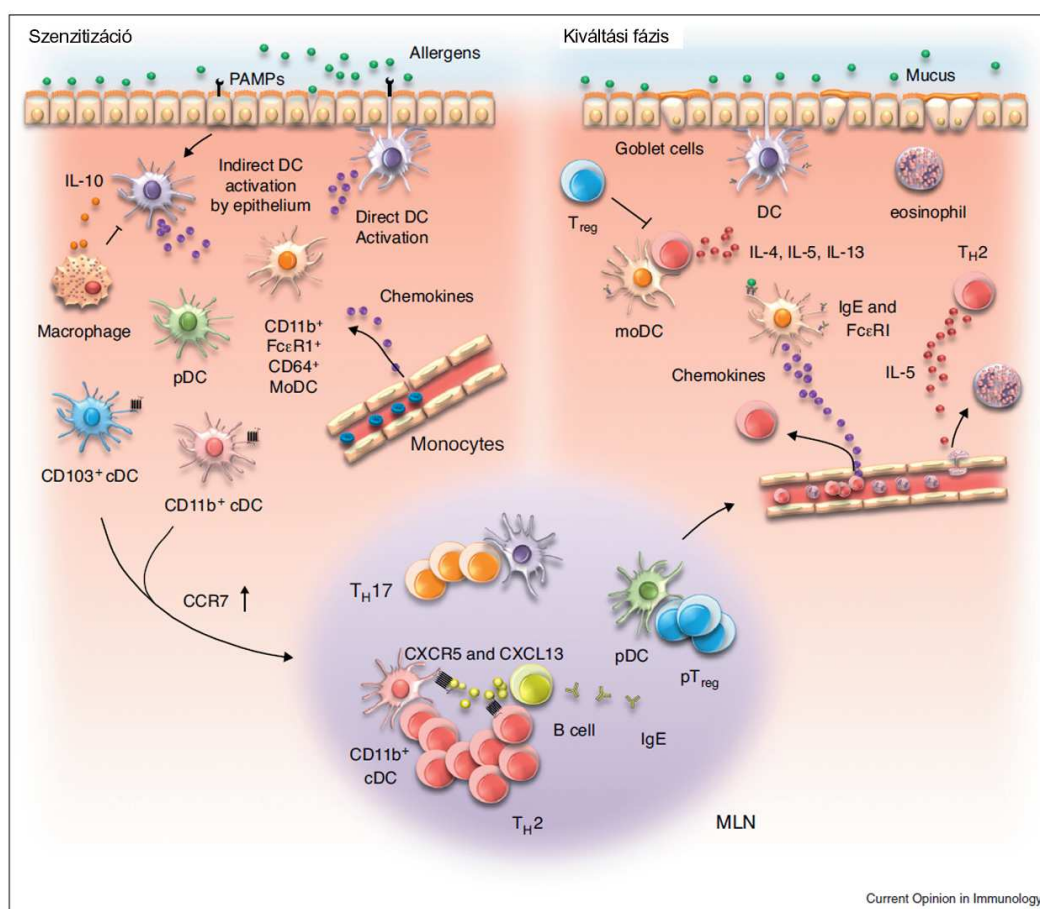
2. ábra A vérben található, humán DC alpopulációk és az immunválaszban betöltött legfontosabb funkcióik

Az ábrán bemutatott DC populációk közül a BDCA-1⁺ és a BDCA-3⁺ klasszikus vagy konvencionális DC-k, valamint plazmacitoid DC-k a tüdőben is kimutathatók. Th: CD4⁺ helper T-sejt, Tc: CD8⁺ citotoxikus T-sejt. (Forrás: Collin et al., Immunology. 2013, 140:22-30. [102])

2.5. A DC-k szerepe a légúti allergiás betegségeken

A DC-k a légúti nyálkahártyában nagy számban vannak jelen, és őrszemként folyamatosan monitorozzák a környezetüket, melynek során különbséget tesznek veszélyes (patogénből származó) és ártalmatlan antigének között. Ebben a folyamatban a különböző DC altípusok más-más funkciókat képviselve vesznek részt. Az allergiás folyamatokban a CD11b⁺ migratorikus DC-k a felelősek a Th2 sejtválaszok elindításáért [103]. Az allergénnel való első találkozás során az allergiás reakciók elindításához aktiválódniuk kell, hogy az allergén felvétele után a közeli nyirokcsomóba vándoroljanak, ahol prezentálják a feldolgozott allergén fragmenteket a T-sejtek számára és elindítják a dominánsan Th2 jellegű immunválaszt (3. ábra). A Th2 sejtek az általuk termelt IL-4, IL-5 és IL-13 citokinek révén szabályozzák az allergiás válaszok jellemző folyamatait, így az eozinofil aktivációt, a fokozott nyáktermelést és a simaizom sejtek hiperreaktivitását [104, 105]. Régebben úgy gondolták, hogy a légúti allergiás betegségeket kizárólag a Th2 dominanciával jellemezhető adaptív immunválasz mediálja. A legújabb kutatási eredmények szerint azonban a természetes immunrendszer sejtjei, a 2-es típusú veleszületett limfociták (ILC2) is fontos szerepet töltenek be ezekben a folyamatokban, hiszen az ILC2 sejtek is képesek IL-4, IL-5 és IL-13 termelésére [106-108]. Súlyos allergiás asztmában fontos szerepük van még a Th17, a Th9 és a γδT-sejteknek is [109-111]. Egérkísérletben bizonyították, hogy a tüdőben a DC-k

depléciójának hatására megszűnik a Th2 citokin szekréció és az asztma jellegzetes tünetei sem alakulnak ki. A tanulmány szerint tehát a DC-k nélkülözhetetlenek a megfelelő Th2 immunválasz kialakulásához [112]. Ezek a sejtek azonban nemcsak az allergiás folyamatok szenzitizációs fázisában kialakuló Th2 válaszhhoz elengedhetetlenek, hanem az ismételt allergén expozíciót követő immunválaszok irányításához is [113]. Az allergiás immunválasznak ebben a szakaszában a DC-k a légutak olyan területein halmozódnak fel, ahol kapcsolatba kerülhetnek az effektor T-sejtekkel és kemokin termelés révén további effektor T-sejteket toboroznak a tüdő perifériás szöveteibe [94].



3. ábra. A különböző DC alpopulációk szerepe az allergiás légúti gyulladás szenzitizációs és kiváltási fázisában

Az egerek tüdejében steady-state körülmények között három különböző DC alpopulációt lehet kimutatni: plazmacitoid DC-t (pDC), CD103⁺ konvencionális DC-t (cDC), és CD11b⁺ konvencionális DC-t. Allergén expozíciót követően monociták lépnek ki a vérkeringésből, és CD11b⁺ CD64⁺ FcεRI⁺ monocita eredetű DC-vé (moDC) differenciálódnak. (Forrás: van Helden és Lambrecht, *Curr Opin Immunol.* 2013, 25:745-54; [114])

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a bazofil és az eozinofil sejtek is képesek antigén prezentációra és az allergiás immunválasz beindítására [115-118]. Azonban ennek egyértelmű bizonyítására még nem áll elegendő adat a rendelkezésünkre. Valószínűleg inkább arról van szó, hogy ezek a sejtek a DC-kkel együttműködve váltanak ki Th2 immunválaszt a megfelelő citokin környezet biztosítása révén, ugyanis a DC-k nem tudnak a Th2 polarizáció elindításához szükséges IL-4-et termelni [112, 119].

Amint korábban ismertettem, ahhoz, hogy a DC-k szerzett immunválaszt tudjanak kiváltani, aktiválódniuk kell, majd CCR7-függő módon a nyirokcsomóba kell vándorolniuk. A DC-k sokféle patogén- és veszély-asszociált molekuláris mintázat (PAMP és DAMP) felismerésére képesek különböző mintázat felismerő receptoraik (PRR-ok) révén. Rendelkeznek Toll-like receptorokkal (TLR-ek), Nod-like receptorokkal (NLR-ek), C-típusú lektin receptorokkal és RIG-like helikázokkal (RLH) is [120, 121]. Ezeken kívül kifejeznek számos, az aktivációjukban nagy szerepet játszó citokin receptort is a felszínükön. Ismert, hogy számos allergén képes különböző PRR-okat aktiválni. Azonban az, hogy a felismerés milyen típusú Th választ indít el, az adott allergéntől függ [120, 121]. A földimogyoró Ara h 1 glikoallergénje például a DC-SIGN receptoron keresztül aktiválva a DC-t Th2, míg a házi poratka Der p 1 allergénje ugyancsak a DC-SIGN receptoron keresztül aktiválva Th1 irányú immunválaszt vált ki [122, 123]. A házi poratka Der p 2 allergénjéről leírták, hogy a mieloid differenciációs protein/faktor 2 (MD2) funkcionális homológja, mely a TLR4 jelátviteli komplexének lipopoliszaharid (LPS)-kötő komponense, ilyen módon elősegíti a TLR4 jelátvitelt és a DC aktivációt [124]. A macskaszőr Fel d 1 allergénje a TLR4 jelátvitelt úgy fokozza, hogy elősegíti az LPS-nek a TLR4-hez való kötődését [125]. Bár a DC-k sokféle PRR-t expresszálnak a légúti allergének közvetlen érzékelésére, újabb tanulmányok rávilágítottak arra, hogy a DC-k aktivációjában és az allergének elleni immunválasz elindításban legalább ilyen jelentősége van a légúti epitéliumnak is. Régebbi tanulmányok szerint a légúti epitélium jelentősége abban áll, hogy passzív fizikai barrierként akadályozza meg az allergének átjutását. Azonban mára világossá vált, hogy a légúti hámsejtek dinamikus struktúrák és aktívan képesek felismerni az allergéneket PRR-jaik (TLR, CLR, proteáz aktivált receptorok) segítségével [126]. A felismerés hatására TLR4-függő módon proallergiás citokineket (IL-1, IL-25, IL-33, TSLP, GM-CSF) szekretálnak, továbbá DAMP-okat (ATP, húgysav, HMGB-1) termelnek, melyek képesek a DC-ket és más immunsejteket, például bazofilokat és ILC2 sejteket is aktiválni. Kimutatták, hogy az epitél sejtek TLR4-en keresztüli stimulálása nélkülözhetetlen a DC aktivációhoz. Amennyiben a légúti epitél sejtek nem fejezik ki a TLR4-et, úgy a házi poratka által indukált allergiás gyulladás nem alakul ki [81, 127]. A TLR4-en keresztüli aktiváció hatása endotoxin dózis-függést mutat. Az alacsony dózisú (pg) endotoxint tartalmazó házi poratka kivonat képes az allergiás asztma kiváltására [128], ugyanakkor nagy dózisú endotoxin expozíció gátolja az allergiás folyamatokat [129].

Nemrégiben megjelent epidemiológiai tanulmányok arról számolnak be, hogy azokban a gyerekekben, akik hagyományos tanyasi környezetben nőnek fel, kisebb eséllyel alakulnak ki atópiás betegségek [130, 131]. A tanyasi környezet protektív hatásának pontos mechanizmusa még nem ismert, azonban lehetséges, hogy a folyamatosan jelenlévő, a városi lakásokban mérhetőnél magasabb környezeti endotoxin mennyiségnek tulajdonítható [132, 133]. Az epitélium házi poratka allergén expozíciója DAMP-ok felszabadulása révén is aktiválhatja a TLR4-et, hiszen a HMGB-1 is liganduma a TLR4-nek [134]. Legújabb tanulmányok szerint vad-típusú egerek intranazális parlagfű pollen kezelése fokozza a neutrofil infiltrációt, valamint a CXCL1 és CXCL2 szekréciót. Ez a hatás elmarad a TLR4 KO egerekben, illetve CXCR2 vagy NF- κ B inhibitorok alkalmazásával [135].

2.6. A pollen eredetű adjuvánsok szerepe a DC aktivációban

Amikor pollent lélegzünk be, nemcsak allergén fehérjék jutnak be a szervezetünkbe, hanem számos bioaktív molekula is, amelyek a pollenből kiszabadulva befolyásolhatják a légúti hámsejtek, fagociták és antigén-prezentáló sejtek működését. Egyre több információnk van arról, hogy a pollen eredetű bioaktív anyagok egy részének adjuváns hatása van, és fontos szerepet játszanak az allergiás megbetegedések patogenezisében [136]. Az allergiás gyulladás egy állatmodelljében, a tisztított Amb a 1 fehérje (a parlagfű pollen meghatározó allergénje) önmagában adva nem volt képes áttörni a tolerogén mechanizmusokat, amelyek megakadályozzák a belélegzett ártalmatlan anyagok elleni immunválaszokat, adjuvánssal kombinált kezelésre volt szükség a szerzett immunrendszer aktiválásához [137]. Kiderült, hogy a hidratált pollenszemek szerin és cisztein proteázokat bocsátanak ki magukból [138-140]. A cisztein proteázokról pedig kimutatták, hogy közvetlenül kiválthatják a DC-k érését, még mikrobiális stimulus hiányában is; továbbá a proteáz-aktivált DC-k az immunválasz Th2 irányú polarizációját indítják el [141]. A tolerancia áttörhető, és allergiás légúti válasz indukálható egy ártalmatlan antigén ellen, ha tisztított proteázt adnak hozzá [142]. A szenzitizáció folyamata során a parlagfű pollen cisztein és szerin proteáz, illetve amidopeptidáz aktivitásának köszönhetően megnő a transzsepitéliális permeabilitás, így a pollen allergének átjutnak az epitélium védővonalán, ugyanis megbomlanak az epitelsejtek között lévő *tight junction* kapcsolatok [140]. A pollen allergének így nagyobb mennyiségben jutnak el a DC-khez, ezáltal lehetővé válik a szenzitizáció és a gyulladás kialakulása. Ezen kívül a pollenszemekből bioaktív lipidek is felszabadulhatnak [143, 144]. Ezek a pollen asszociált lipid mediátorok kémiaiilag az E1 fitoprosztánok csoportjába tartoznak, melyek a prosztaglandin E2-vel mutatnak szerkezeti és funkcionális hasonlóságot. Gátolják az NF- κ B transzlokációját így a DC-k IL-12 termelését is, elősegítik a sejtfelszíni CXCR4 receptorok

kifejeződését, valamint gátolják a CCR1 és a CCR5 kifejeződését, ennek következtében képesek befolyásolni a DC-k migrációját. A pollen eredetű lipid mediátorok hatására a DC-k LPS-indukált CCL5, CXCL10 és CCL22 szekréciója megemelkedik, és ez befolyásolja a Th2 sejtek migrációját [145].

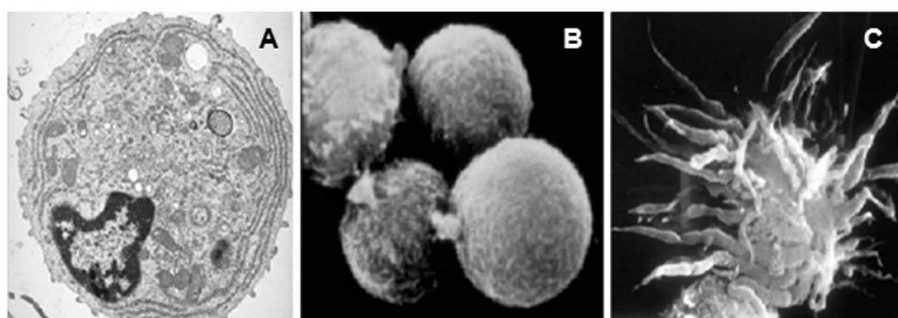
A pollen metabolom vizsgálata során kiderült, hogy a pollen kivonatok vizes fázisa más immunmoduláns anyagokat, így adenozint is tartalmaz. Kimutatták, hogy az adenozin az A2 receptorokon keresztül cAMP-t indukál és gátolja a DC-k IL-12 szekrécióját és a Th1 immunválaszokat, így kedvezve a Treg sejtek működésének [146]. Ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy a pollen eredetű proteázok, lipidek és az adenozin részt vesznek a DC-k funkcióinak modulálásában, ezáltal hozzájárulnak az allergiás gyulladás kialakulásához.

2.7. A plazmacitoid DC-k jellemzői

A pDC-k nem fejeznek ki mieloid markereket (pl. CD11c, CD13 és CD33), viszont expresszálnak limfoid sejtekre jellemző antigéneket (pl. CD2, CD5, CD7 és CD45RA), valamint kimutathatók bennük az átrendeződött immunglobulin nehézlánc D-J génszegmensek is. Ezért nem meglepő, hogy korábban ezeket a sejteket egyértelműen limfoid eredetűnek gondolták. Mára kiderült, hogy pDC-k fejlődési útvonala a csontvelőben nagyon flexibilis, mieloid és limfoid progenitorokból is kialakulhatnak [73]. Bonyolultabbá teszi a képet az a megfigyelés, hogy bár a közös mieloid prekursorokból is kialakulhatnak pDC-k, az ilyen sejtek többségében nincsenek jelen az átrendeződött D-J nehézlánc génszegmensek [147]. Amikor csontvelői sejteket fms-szerű tirozin kináz-3 (Flt3) ligandummal kezeltek, kiderült, hogy a közös limfoid progenitor útvonal tartalmaz egy átmeneti, köztes előalakot, amiből B-sejtek és pDC-k is kifejlődhetnek [147]. Egy nemrégien megjelent tanulmány szerint a pDC-k kialakulását a közös limfoid progenitorokból Flt3-közvetített szignálok mellett, az I-es típusú IFN-mediált jelátviteli útvonalak is jelentősen befolyásolják [148]. A közös limfoid progenitorok között több olyan sejt van, amely Flt3 receptort (CD135) fejez ki, mint a közös mieloid progenitorok között, ami azt sugallja, hogy a pDC-k nagyobb hányada származhat limfoid előalakból, mint mieloidból. Fontos megjegyezni, hogy a pDC-k eredetét vizsgáló kísérletek zömét egér prekursor sejteken végezték, sokkal kevesebb adatunk van a pDC-k kialakulásáról az emberi szervezetben. Az azonban egyértelműnek tűnik, hogy a bennünk zajló pDC kialakulás is rendkívül flexibilis folyamat, és többféle progenitor sejtől kiindulva is végbemehet [102].

Speciális PRR mintázatuk alapján úgy tűnik, hogy a pDC-k arra specializálódtak, hogy a szervezetbe bejutott idegen nukleinsav molekulákat ismerjék fel. Az endoszomális TLR-ek közül a TLR7-et és a TLR9-et is kifejezik [149]. A TLR7 a virális egyszálú RNS-eket

ismeri fel, valamint a guanozin analóg vegyületeket, mint például a szintetikus imidazokinolinok (imiquimod, resiquimod). A TLR9 ligandumai a metilálatlan CpG-motívumot tartalmazó oligonukleotidok. Ilyen szekvenciák jelenléte bakteriális és vírus DNS-re jellemző. Nemrégiben sikerült kimutatnunk, hogy a TLR7/9-közvetített aktiváció a rövid, duplaszálú RNS-eket felismerő, citoplazmatikus RIG-I receptor kifejeződését is indukálja a pDC-kben [150]. Az idegen nukleinsav érzékelését követően a pDC-k nagy mennyiségű I-es típusú IFN-t termelnek. Az I-es típusú IFN-ok (az IFN- α és az IFN- β) az antivirális aktivitásuk mellett a pDC-k és a cDC-k érését is irányítják [151]. Nagyfokú specializációjuknak köszönhetően a pDC-k 1000-szer nagyobb mennyiségű I-es típusú IFN termelésére képesek, mint bármely más sejttípus. Ennek a nagymértékű IFN termelésnek a molekuláris részletei sokáig nem voltak ismertek. Ma már azonban tudjuk, hogy ennek a jelenségnek a molekuláris hátterében egy speciális térbeli és időbeli szabályozás áll. Az aktiválódott TLR9 és a hozzákötődő MyD88 adaptor molekula ugyanis közel 30 percig komplexben marad, ami folyamatos MyD88-on keresztüli jelátvitelt tesz lehetővé, és így a pDC-kben állandóan magas szinten tartott IRF7 expresszió az I-es típusú IFN gének fokozott átírását eredményezi [152, 153]. A pDC-k a szokatlanul nagymértékű IFN termelést követően hivatásos APC-kké differenciálódhatnak, és elindíthatják az adaptív immunválaszokat [154]. Ezt a kettősséget alapul véve, az irodalomban az IFN-termelő, kerekded állapotra a plazmacitoid pre-dendritikus sejt, vagy a professzionális I-es típusú IFN-t termelő sejt elnevezés, míg a nyúlványos megjelenésű APC állapotra a plazmacitoid dendritikus sejt elnevezés vált elfogadottá (4. ábra).



4. ábra. A plazmacitoid pre-dendritikus és dendritikus sejtek morfológiája

(A) A humán plazmacitoid pre-dendritikus sejtek plazmasejtszerű morfológiát mutatnak. Jellemző rájuk a jól fejlett endoplazmatikus retikulum az intenzív protein szintézisnek (I-es típusú IFN-ok) megfelelően. (B) Pásztázó elektronmikroszkópos felvételen ezek az IFN-termelő sejtek kerekded, limfoid morfológiát mutató, 8-10 μm átmérőjű képletekként jelennek meg. (C) Érett, aktivált állapotban a sejtekre a nyúlványos, DC morfológia jellemző. (Forrás: Liu et al., *Annu. Rev. Immunol.* 2005, 23:275-306; [155])

Fiziológiás körülmények között a pDC-k a csontvelőben, a limfoid szervekben és a perifériás vérben is megtalálhatók. A perifériás vérben a mononukleáris sejteknek mindössze ~0,2 – 0,8%-át teszik ki. A humán perifériás vérben található pDC-k fenotípusukat tekintve Lin⁻ HLA-DR⁺ CD4⁺ CD45RA⁺ CD123⁺ ILT3⁺ ILT1⁺ CD11c⁻ sejtek. Specifikus sejtfelszíni antigénjeik a BDCA-2, illetve a BDCA-4 fehérjék. A felszínükön nagy mennyiségben fejezik ki az IL-3 receptor α -láncát (CD123), ugyanis az IL-3 citokin fontos szerepet tölt be a pDC-k érési és differenciálódási folyamataiban is [155]. Fertőzés [156], gyulladás [157], és tumorképződés [158] esetén a pDC-k képesek elhagyni a vérkeringést, és a perifériás szövetekbe, vagy a környéki nyirokcsomókba vándorolnak [159]. Az érett, aktiválódott pDC-k a perifériás szövetekből a nyirokkeringés révén a nyirokcsomókba vándorolnak [159], ahol hivatásos APC-kként antigéneket mutatnak be a naív T-sejtek számára. Hasonlóan a cDC-khez, a pDC-k is képesek keresztprezentációra (exogén antigének MHC-I molekulán keresztül történő bemutatása a T-sejteknek) [160]. A pDC-k nagyfokú plaszticitását mutatja, hogy képesek indukálni szinte minden T-sejt differenciációs útvonalat, beleértve a Th1, Th2, Th17 és Treg irányú polarizációt is [161, 162]. A pDC-k által kiváltott T-sejt válasz nagymértékben függ az antigén stimulus fajtájától, a sejteket érő citokin ingertől, illetve az adott szöveti környezettől, melyek mind befolyásolhatják a pDC-k fenotípusos és funkcionális differenciálódását. Ennek megfelelően, például az I-es típusú IFN-ok által aktivált pDC-k a Treg sejtek képződését segítik elő, a hízósejtekből származó IL-3 által stimulált pDC-k a Th2 limfociták kialakulásának kedveznek, míg a CpG-oligonukleotidok és a CD40 ligandum által aktivált pDC-k a Th1 sejtek differenciálódást teszik lehetővé [163]. Egyes tanulmányok szerint a részlegesen aktivált pDC-k tolerogén tulajdonsággal rendelkeznek, ugyanis nagymértékű indukálható kostimulatórikus-ligand (ICOS-L) expressziójuk esszenciális szignált biztosít az IL-10-termelő FOXP3⁺ Treg sejtek túléléséhez [164, 165]. A pDC-k tolerogenitása bizonyított számos humán tumoros elváltozás, így például mell-, illetve méhnyakrák esetében is [131, 165, 166]. Ugyanakkor immunstimuláló hatásuk megkérdőjelezhetetlen az antivirális immunválaszban, valamint különböző autoimmun kórképekben, mint például szisztémás lupus erythematosusban, illetve psoriasisban is [161]. A humán pDC-knek ez a kettős tulajdonsága, hogy tolerogén, illetve immunogén irányba is képesek polarizálni az adaptív immunválaszt, felhívja a figyelmet ennek a sejttypusnak a jelentőségére a különböző immunfolyamatok szabályozásában.

2.8. A plazmacitoid DC-k szerepe az allergiás válaszokban

Annak megfelelően, hogy a pDC-k sokkal kisebb számban fordulnak elő a szervezetben, mint a konvencionális DC-k, jóval kevesebb tanulmány vizsgálta ezeknek a sejteknek a szerepét az allergiás reakciók mechanizmusában. Az egyik első ilyen

tanulmányban Uchida és mtsai azt találták, hogy a HLA-DR⁺ CD11c⁻ CD123⁺ 2-es típusú DC-k száma (ezeket a sejteket később pDC-kként azonosították) kb. kétszer nagyobb az atópiás egyének perifériás vérében, mint az egészségesekben [167]. Későbbi vizsgálatok a pDC-k megnövekedett számáról számoltak be felnőtt asztmás betegek vérében, függetlenül az atópiás státuszuktól [168, 169]. Az 5 és 7 év közötti gyermekeknél azonban számos tanulmány fordított korrelációt mutatott ki a keringő pDC-k száma és az asztma státusz között [170-172]. Ez a felnőttek és gyerekek körében megfigyelhető ellentétes kapcsolat a perifériás vér pDC-száma és az asztma státusz tekintetében azt sugallja, hogy a különböző életkorú csoportok esetén a pDC-k eltérő szerepet töltenek be a légúti tolerancia vagy az allergiás gyulladás kialakításában, és további vizsgálatok szükségesek a pDC-k kettős szerepének tisztázására. *In vivo* tanulmányokban az Flt3-ligandot azonosították, mint olyan potenciális citokint, amelynek szisztémás adásával csökkenteni lehet a légúti allergiás reakciókat [173-176]. Az Flt3-L fontos szerepet játszik a pDC-k fejlődésében [148], ezért a kutatók figyelme hamar a pDC-kre irányult, mint lehetséges tényezőkre a csökkent allergiás légúti gyulladás hátterében. Annak az elképzelésnek a bizonyítására, hogy a pDC-knek allergia ellenes hatásuk lehet, Kool és mtsai kimutatták, hogy allergénnel kezelt egerekben az Flt3-L beadása fokozta a pDC-k gyakoriságát a tüdőben, amely csökkent Th2-asszociált eozinofil gyulladást eredményezett. A pDC-knek még az allergén expozíció előtti depléciója (anti-CD123 monoklonális ellenanyaggal, 120G8) megszüntette az Flt3-L kezelés anti-inflammatorikus hatását, míg a pDC-k adoptív transzfere visszaállította azt [177]. A pDC-knek a légúti tolerancia kialakításában való közreműködését több további egér kísérletben is bizonyították [178, 179]. Azonban az egérkísérletes tanulmányok interpretálását komplikálttá teszi, hogy az egerekben nemrégiben három különböző pDC altípust azonosítottak [180]. Ebből a három altípusból csak a CD8α⁺β⁻ és a CD8α⁺β⁺ pDC-k rendelkeznek tolerogén képességgel a Foxp3⁺ T-sejtek indukciója révén, míg a CD8α⁻β⁻ altípus a CD4⁺ effektor T-sejtek aktiválásában hatékonyabb.

Fiatal felnőttekben megfigyelték, nazális allergén kezelés hatására a pDC-k az orrnyálkahártyába infiltrálódtak, és ez a migráció feltételezhetően L-szelektin-függő (CD62L) mechanizmussal történt [181]. Ugyanez a kutatócsoport egy következő tanulmányában igazolta, hogy felső légúti allergiában szenvedő felnőttekből (25-53 éves) izolált pDC-k autológ T-sejtekkel együtt tenyésztve az Th2-polarizációt segítik elő, Phl p proteinnel, a mezei komócsin fő allergénjével, való stimuláció után [182]. Egy ehhez hasonló *in vitro* kísérletben házi poratka-szenzitizált allergiás betegekből származó pDC-kkel együtt tenyésztett T-sejtek csak kevés IFNγ-t és nagy mennyiségű IL-4-et termeltek a házi poratka fő allergénje, a Der p 1 jelenlétében. Ez szintén azt sugallja, hogy a pDC-k képesek Th2-polarizációt elindítani [183].

A pDC-k száma mellett úgy tűnik, hogy azok funkciója is eltér az allergiás állapotokban. Több munkacsoport is kimutatta, hogy az allergiás vagy asztmás donorokból izolált pDC-k a CpG vagy vírusok általi TLR9 aktiváció után kevesebb IFN γ indukáltak az együtt tenyésztett T-sejtekből [184-187]. Ennek a csökkent válasznak a pontos oka nem ismert, de elképzelhető, hogy a TLR9 receptor egy pontos nukleotid polimorfizmusa áll a háttérben, ugyanis a TLR7 és a TLR8 receptorok polimorfizmusának az asztmával való szoros asszociációját már korábban igazolták [188]. Minthogy az antigén-specifikus IgE és annak receptora, az Fc ϵ RI kritikus szereppel bír az allergiás asztma kialakulásában, felmerül az a fontos kérdés, hogy a pDC-k kifejezik-e az Fc ϵ RI-et, és ha igen, az szerepet játszik-e az allergiás légúti gyulladásban. Foster és mtsai bebizonyították, hogy a perifériás vérben található DC-k kifejezik az Fc ϵ RI-et; továbbá hogy allergiás asztma esetén a pDC-ken expresszált Fc ϵ RI mennyisége korrelál a szérum IgE szinttel és a betegség súlyosságával [189]. Egészséges és asztmás felnőttekből származó pDC-k I-es típusú IFN válaszait vizsgálva, egy fordított szabályozást figyeltek meg a TLR9- és az Fc ϵ RI-mediált válaszok között [184, 186]. Valószínűleg két fő faktor vesz részt a TLR9 működésének az Fc ϵ RI általi negatív szabályozásában: 1) az Fc ϵ RI kereszt kötése képes aktiválni az ITIM-et, mely egy ITIM-et tartalmazó gátló receptor, ami negatívan regulálja az IFN termelést [190, 191]; 2) Fc ϵ RI-nek az IgE-mediált aktivációja TNF- α termelést indukál, ami autokrin visszacsatoláson keresztül gátolja az I-es típusú IFN termelést [192]. Ez azt jelenti, hogy azokban az egyéneknél, akiknél magas a keringő IgE mennyisége, a pDC-ken kifejeződő Fc ϵ RI kereszt kötése gyengíti az antivirális válaszokat. Összefoglalva úgy tűnik, hogy az I-es típusú IFN által indukált Th1 és az IL-4/IL-13-mediált Th2 válaszok közötti bonyolult egyensúly kialakításában a pDC-k is részt vesznek. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, amely szerint az IL-4 és az IL-13 csökkenteni képes a pDC-knek a vírusokra adott válaszkészségét [193].

3. CÉLKITŰZÉSEK

3.1. Célunk volt a pollen kivonatok szabadgyök-termelő képességének vizsgálata, valamint a pollen eredetű ROS szerepének meghatározása a légúti allergiás gyulladásban.

3.2. Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a pollen eredetű oxidatív stressz hatását az allergiás kötőhártya-gyulladás kialakulásában.

3.3. Kíváncsiak voltunk, hogy a fűféléknél korábban leírt szubpollen részecske kibocsátás megfigyelhető-e a hidratálódó parlagfű pollenszemeknél, és ezek a szubpollen részecskék képesek-e légúti allergiás gyulladást kiváltani.

3.4. Célunk volt annak a vizsgálata, hogy a pollen NAD(P)H oxidázok által termelt ROS eliminálása lokálisan alkalmazott antioxidánsokkal csökkenti-e az allergiás légúti gyulladás mértékét.

3.5. Meg kívántuk vizsgálni a laktoferrin, egy vas-kötő fehérje, hatását a parlagfű pollen által kiváltott allergiás légúti gyulladásra.

3.6. Az oxidatív stressz a mitokondriumok károsodásához vezethet. Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk vajon a károsodott mitokondriumok jelenléte a légúti hámsejtekben befolyásolja-e az allergiás légúti gyulladás kialakulását.

3.7. Célunk volt a 8-oxoguanin (8-oxoG), mint a leggyakrabban előforduló oxidálódott DNS-bázis, és javító enzimének, a 8-oxoguanin DNS-glikoziláz 1 (OGG1) fehérje szerepének feltérképezése az allergiás légúti gyulladásos folyamatokban.

3.8. Az volt a célunk, hogy megvizsgáljuk a parlagfű pollenszemekkel történő közvetlen kölcsönhatás képes-e aktiválni a humán monocita eredetű dendritikus sejteket. Arra is kíváncsiak voltunk, hogy a pollen eredetű ROS szerepet játszik-e az aktiválási folyamatban.

3.9. Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a parlagfű szubpollen partikulák NAD(P)H oxidáz enzimjei által termelt szabadgyökök hogyan hatnak a humán dendritikus sejtekre.

3.10. Kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy különböző koncentrációjú és időtartalmú H₂O₂ kezelés hogyan befolyásolja a humán pDC-k életképességét, fenotípusos jellemzőit, citokin termelését, T-sejt aktiváló és T-sejt polarizáló képességét.

3.11. Célunk annak vizsgálata volt, hogy az extracelluláris térbe jutó mitokondriális DNS hogyan befolyásolja a humán plazmacitoid dendritikus sejtek fenotípusos, illetve funkcionális sajátosságait. Tisztázni akartuk azt is, hogy az mitokondriális DNS oxidatív módon módosított formájának vajon hasonló, vagy eltérő az immunmoduláló kapacitása, mint a natív formának.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Etikai engedélyek: A kísérletekhez használt, humán eredetű vérkészítményeket az Országos Vérellátó Szolgálat debreceni Regionális Vérellátó Központjából kaptuk. A humán vérkészítményekkel végzett munkát az Országos Vérellátó Szolgálat igazgatója, valamint a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrumának Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte. Minden vérvétel a donorok előzetes, írásos beleegyezésével történt és a donorok adatainak feldolgozása, valamint megőrzése az Orvos Világszövetség által kiadott Helsinkai Nyilatkozat etikai irányelveit követve valósult meg.

Az állatkísérleteket a National Institutes of Health (NIH) előírásainak megfelelően, az University of Texas Medical Branch (UTMB) Animal Care and Use Committee engedélyével végeztük el.

Pollenszemek és pollen kivonatok: Kísérleteinkhez az endotoxin-mentes pollen kivonatokat, valamint intakt pollenszemeket (Greer Laboratories) használtunk. Egyes kísérletekhez frissen gyűjtött, vagy a Greer Laboratories-tól származó parlagfű pollenszemeket steril vízben hidratáltuk 90 percig, majd a kibocsátott szubpollen részecskéket frakcionált centrifugálást követően foszfát pufferelt sóoldatban (PBS) gyűjtöttük össze.

Sejtkultúrák: Az A549, a HL-60, az NCI-H292, az MDCK és az SP2/0-Ag14 sejtvonalakat az ATCC-től szereztük be, a primer NHBE sejteket a Cambrex Bioproducts-tól vásároltuk meg.

Állatkísérletek: Az *in vivo* kísérletekhez használt BALB/c, 129Sv, C57BL/6 WT, C57BL/6J-Kit^{W-v} (hízósejt-deficiens), NOD WT, és NOD SCID (B-sejt-, T-sejt-, és Ig-deficiens) egerek a Harlan vagy a Jackson Laboratory-tól származtak. Az allergiás légúti gyulladás kísérleti modelljében az egereket a 0. és a 4. napon parlagfű pollen kivonat és Alum (Pierce) 1:1 arányú keverékével intraperitoneálisan oltottuk, majd a 11. napon parlagfű pollen kivonattal vagy szubpollen részecske szuszpenzióval kezeltük intranazálisan. Egyes kísérletekben a pollen kivonatokkal együtt antioxidánsokat, vagy laktoferrint is bejuttattunk az egerek légútjaiba. Az allergiás légúti gyulladás kialakulását 72 órával az intranazális kezelés után vizsgáltuk. Szeparált kísérletekben 129Sv egereket iv. SP2/0-Ag14 sejtekből izolált mtDNS preparátumokkal oltottunk, DOTAP (Sigma-Aldrich) transzfekciós reagensben felvéve. A kezelés után 6 órával az egerekből vérmintákat gyűjtöttünk.

A légúti gyulladás súlyosságának értékelése: Az allergiás légúti gyulladás mértékének meghatározásához a bronchoalveoláris mosófolyadék (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) sejtes összetételét analizáltuk, Enzim-kötött immunszorbens módszerrel (ELISA) mértük a mucin (MUC5AC) koncentrációját a BALF mintákban, illetve a tüdők szövettani metszeteiben

hematoxilin-eozin festés után a gyulladásos sejtek infiltrációját, PAS festés után a mucin termelő sejtek számának változását vizsgáltuk.

A reaktív oxigén származékok detektálása: A ROS szintjét a redox-szenzitív 2',7'-dihidro-diklorofluoreszcein diacetát (H₂DCF-DA), nitroblue tetrazólium (NBT), vagy citokróm c felhasználásával határoztuk meg. Az intracelluláris ROS-szintek méréséhez a sejteket H₂DCF-DA oldattal 20 percig inkubáltuk 37 °C-os termosztátban, majd a fölösleges festéket eltávolítottuk. A különböző kezeléseket követően az intracelluláris diklorofluoreszcein (DCF) fluoreszcencia intenzitását fluoriméterrel vagy áramlási citométerrel detektáltuk. A RWE-kezelt A549 sejtek, és az izolált mitokondriumok H₂O₂ termelését Amplex Red festék felhasználásával mértük.

Az oxidatív stressz kimutatása a légutakban: Az egerek légúti lavage mintáiban a GSSG és a lipidperoxidációs származékok (MDA és 4-HNE) szintjét glutathione/GSSG-412 (OXY), valamint LPO-586 (OXY) kitek segítségével határoztuk meg. A 4-HNE-protein komplexeket a tüdő lízátumokban Western blot analízissel detektáltuk. A ROS-szintek változását az egerek légúti hámsejtjeiben *ex vivo* kezelés után, H₂DCF-DA és NBT felhasználásával is követtük.

Szuperoxid-termelő fehérjék detektálása: A pollen kivonatok O₂^{•-} termelésére képes fehérjéinek kimutatására *in situ* gél NBT próbát használtunk. A fehérjét először 6%-os natív poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE) 4 °C-on elválasztottuk, majd a gél NBT oldatban áztattuk. NADPH hozzáadása után, a gélben a formazán kiválásának megfelelően lilás-kékes sávok jelentek meg.

Az allergiás kötőhártya-gyulladás modellje: Az egereket a 0. és a 4. napon parlagfű pollen kivonat és Alum 1:1 arányú keverékével intraperitoneálisan szenzitizáltuk, majd a 10. napon parlagfű pollen szuszpenziót cseppentettünk a szemükbe. A lokális kezelést követően, 20 perc múlva értékeltük az azonnali túlérzékenységi reakció klinikai tüneteit. A hízósejtek degranulációját, valamint a gyulladásos sejtek infiltrációját a conjunctivából készített szövettani metszeteken vizsgáltuk Giemsa, ill. hematoxilin-eozin festés után.

Szubpollen részecskék vizsgálata: A kibocsátot parlagfű szubpollen részecskék méretének meghatározása méret kalibrációs kit (Molecular Probes) felhasználásával, áramlási citometriával történt.

Az Amb a 1 allergén azonosítása: A parlagfű szubpollen részecskék 38 kD-os proteinjének azonosítása Western blot analízist követően mikroszekvenálással történt. Az N-terminális

vég 15 aminosavának sorrendjét 494/HT Procise szekvenáló rendszerrel a Protein Chemistry Laboratory (UTMB at Galveston) határozta meg.

Az oxidált mitokondriális proteinek azonosítása: Parlagfű pollen kivonattal kezelt A549 sejtekből izoláltuk a mitokondriumokat. A mitokondriális fehérjéket DNPH-val kezeltük, majd 10 %-os SDS-PAGE segítségével elválasztottuk. A karbonilált fehérjék detektálásához anti-DNP ellenanyagot (Chemicon/Millipore), a mitokondriális légzési lánc komponenseinek azonosításához OXPHOS ellenanyag koktélt használtunk (MitoSciences). Szeparált kísérletekben SDS-PAGE után a Coomassie kékkel megfestett gélekből kivágtuk a protein sávokat. Tripszines emésztést követően a tömegspektroszkópiás analízist egy 4800 MALDI-TOF/MS készüléken (Applied Biosystems), a Swiss-Prot adatbázis és a Mascot algoritmus felhasználásával a Biomolecular Resource Facility-ben (UTMB at Galveston) végezték el.

Az mitokondriális fehérjék kifejeződésének gátlása: A mitokondriumok működésének gátlásához csökkentettük az UQCRC2 fehérje kifejeződését az egerek légúti hámsejtjeiben. Ehhez a szenzitizált BALB/c egereket 36, 24 és 12 órával a parlagfű pollen kivonat légutakba juttatása előtt foszforotioát-módosított antiszensz oligonukleotidokkal kezeltük. Kontrollként UQCRC1 antiszensz oligonukleotidokat használtunk. Az UQCRC1 és UQCRC2 fehérjék kifejeződésének megváltozását tüdő szövettani metszetekben fluoreszcens mikroszkópiával detektáltuk.

Penh index meghatározása: A bronchiális hiperreaktivitást teljes-test-pletizmográfiával (Buxco Electronics) mutattuk ki. Az egereket Buxco kamrában növekvő koncentrációjú methacholin kezeléseknek tettük ki, és meghatároztuk a Penh indexet (enhanced pause of breathing).

Comet esszé: A 8-oxoG mennyiségét a szeparált légúti hámsejtekben OGG1 FLARE™ Comet esszével (Travigen) határoztuk meg. A sejteket agarózba ágyaztuk, majd lizáltuk. A detergens kimosása után a DNS-t OGG1 enzimmel emésztettük, majd elektroforézisnek vetettük alá. A sejtmagokból „kihúzódo” DNS csóvák analízisét Comet Assay IV v4.2 szoftver felhasználásával végeztük el.

Az Ogg1 kifejeződésének gátlása: A légúti hámsejtekben található Ogg1 expresszióját siRNS technikával (stealth RNAi™, Invitrogen) gátoltuk. Enyhe anesztézia alatt az egereket intranazálisan kezeltük Ogg1-specifikus vagy kontroll siRNS-sel a szenzitizálás kezdetétől számított 8. és 10. napon. A génexpresszió változást izolált hámsejteken detektáltuk qRT-PCR és Western blot módszerrel.

Primer humán sejtek izolálása: Kísérleteinkhez a monocitákat, a pDC-ket és a T-sejteket egészséges véradók perifériás vérének mononukleáris sejtjeiből (PBMC) nyertük. Első lépésként a heparinos, buffy coat készítményt Ficoll-Paque (GE Healthcare) oldatra rétegeztük 1:1 arányban, majd gradiens centrifugálással elválasztottunk a PBMC réteget a vér további sejtjes alkotóitól. Az így nyert vörösvértest- és trombocita-mentes PBMC-ből ezt követően mágneses izolálási technikán alapuló sejtizoláló kitek segítségével nyertük ki a kísérletekhez szükséges sejtpopulációkat. A pDC-k, valamint a naív CD4⁺ T-sejtek esetében negatív szelekción alapuló, míg a CD14⁺ monociták és a CD3⁺ pan-T-sejtek esetében pozitív szelekciós eljárásokon alapuló kiteket alkalmaztunk, melyeket a Miltenyi Biotec cég forgalmaz. A szeparálást követően a sejtpopulációk tisztaságát az adott sejtpopulációkra jellemző specifikus markerek alapján FACSCalibur áramlási citométer (BD Biosciences Immunocytometry Systems) segítségével ellenőriztük.

Humán DC-k differenciálása CD14⁺ monocitákból: A frissen izolált CD14⁺ monocitákat 80 ng/ml granulocita-makrofág-kolónia stimuláló faktort (GM-CSF) (Gentaur Molecular Products) és 100 ng/ml IL-4-et (PeproTech EC) hozzáadásával (a szeparálást követő 0. illetve 2. napon adtuk a sejtekhez) DC-kké differenciáltattuk. Az 5. napon a sejtek több mint 90%-a éretlen DC fenotípust (DC-SIGN/CD209⁺, CD14⁻) mutatott.

Humán DC-k pollen kezelése: Kísérleteink során a monocita eredetű DC-ket intakt parlagfű pollenszemekkel (1 pollen/ 100 sejt), vagy frissen izolált parlagfű szubpollen partikulákkal (15 szubpollen részecske/ sejt) NADPH jelenlétében és hiányában kezeltük. A kontroll kísérletekben 72°C-on 30 percig inaktivált pollenszemeket, és szubpollen partikulákat, illetve NADPH oxidáz gátló difenil-iodóniumot (DPI) vagy antioxidánst (*N-tert*-butil- α fenilnitrón) alkalmaztunk.

A szubpollen partikulákban izolálása és ROS-termelő képességének vizsgálata: Az SPP-ket intakt parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia*, Greer Laboratories) pollenszemekből izoláltuk, endotoxin-mentes desztillált vízben történő hidratálást követően. A megmaradt intakt pollenszemeket alacsony sebességen történő centrifugálással távolítottuk el. A felülúszóból szűrést (Minisart Sterile 5 μ m Filter, Supelco Analytical) követően, magas fordulatszámon történő centrifugálással nyertük ki az SPP-ket. A partikulákat tartalmazó pelletet steril, endotoxin-mentes PBS oldatban vettük fel és Neubauer kamra segítségével meghatároztuk az SPP-k darabszámát, illetve vizsgáltuk a frissen izolált SPP szuszpenziók endotoxin tartalmát PyroGene™ Endotoxin Detection Assay Kit (Lonza Group Ltd.) felhasználásával. Az SPP preparátumokban detektálható igen alacsony endotoxin koncentráció (28 pg/ml) alapján elmondható, hogy kísérleteinket az SPP preparátumok endotoxin tartalma nem befolyásolhatta. A frissen izolált SPP-k NAD(P)H oxidáz enzimaktivitás vizsgálatához

H₂DCF-DA festéket (Invitrogen) és szubsztrátként NADPH-t használtunk. Az enzimaktivitás hatására történő fluoreszcencia intenzitás-változást Synergy HT multiplate olvasóval (Bio-TEK® Instruments) 488/530 nm hullámhosszon detektáltuk.

Humán DC-k szubpollen részecske felvétele: Annak vizsgálatához, hogy a DC-k képesek-e felvenni a szubpollen részecskéket, a partikulákat fluoreszcens CellVue® Jade festékkel (Polysciences) jelöltük. Ezt követően a sejteket 4 óráig inkubáltuk a fluoreszcens festékkel jelölt szubpollen részecskékkel, majd áramlási citométerrel vizsgáltuk a CellVue® Jade pozitív sejtek arányát a sejt kultúrákban. Szeparált kísérletekben a fluoreszcens festékkel konjugált szubpollen részecskékkel kezelt DC-ket fixáltuk, majd fikoeritrinnel jelölt anti-DC-SIGN antitesttel (R&D System) jelöltük. A sejteket mikroszkóp tárgylemezre vittük fel, majd konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp (Zeiss LSM 510 mikroszkóp, Carl Zeiss AG) segítségével vizsgáltuk.

Humán pDC-k és DC-k aktiválása: A frissen izolált pDC-ket IL-3 jelenlétében (PeproTech) tenyésztettük. A szöveti oxidatív stressz körülményeinek *in vitro* modellezéséhez a sejteket stabilizált H₂O₂ (Sigma-Aldrich) különböző koncentrációival (0,01-10 µM) kezeltük. A kontroll kísérletekben antioxidánsként NAC-t használtunk. A DC-k esetében a különböző kezelések hasonló tápközegben zajlottak, mint a pDC-knél leírtak, kivéve az IL-3 citokin jelenlétét, mely a DC sejt kultúrák számára nem esszenciális. A pDC-k aktiválása TLR7 receptor agonistával is (imiquimod, Invivogen) történt, 24 órán keresztül. Szeparált kísérletekben a pDC-ket tisztított natív, illetve oxidatív módon módosított mtDNS-sel kezeltük, majd 24 órás inkubálást követően elvégeztük a sejtek fenotípusos és funkcionális vizsgálatát. Kontroll kísérletekben a sejteket specifikus TLR9 inhibitorral (Ttaggg, InvivoGen) kezeltük elő 30 percig majd ezt követően adtuk a sejtekhez az mtDNS-eket.

Humán és egér sejtek fenotípusos vizsgálata áramlási citometriával: A kezeléseket követően a sejtek sejtfelszíni markereinek expressziójában bekövetkező változásokat az adott antigén elleni, fluoreszcens festékkel konjugált monoklonális antitestek felhasználásával, áramlási citométerrel detektáltuk. Az általunk használt monoklonális antitestek a következők voltak: anti-CD40, anti-CD83 (mindkettő BD Pharmingen-től), anti-HLA-DR, anti-CD80, anti-HLA-DQ (mindhárom a BioLegend-től), anti-CD86 (R&D Systems), anti-ICOS-L (eBioscience) a humán sejtek vizsgálata során; anti-CD86, anti-I-A/I-E (mindkettő a BioLegend-től), anti-mPDCA-1 (Miltényi Biotec) az egér kísérletekben. A FACSCalibur citométerrel detektált adatok kiértékelése FlowJo szoftver (TreeStar) segítségével történt.

Citokinek és kemokinek mennyiségének meghatározása: A humán DC és pDC sejt kultúrák felülszójából a szekretált citokineket, illetve kemokineket szendvics ELISA módszerrel

határoztuk meg. A vizsgált citokinek és kemokinek az alábbiak voltak: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α , TGF- β 1 (mind a BD Biosciences-től) és IFN- α (PBL InterferonSource). Az egér kísérletekben a vizsgált citokinek és kemokinek az alábbiak voltak: IFN- α (TSZ Scientific LLC.) TNF- α , IL-6 és CXCL1/KC (mind az R&D Systems-től). Az abszorbanciát Synergy HT multiplate olvasó (Bio-TEK Instruments) segítségével detektáltuk. A T-sejtek által termelt citokineket citometriás bead array segítségével detektáltuk. A Human Allergy Mediators kit (BD Biosciences) az IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10 és GM-CSF egyidejű meghatározását tette lehetővé. A méréseket FACSCalibur citométerrel végeztük, az adatokat FCAP array szoftver (BD Pharmingen) segítségével elemeztük.

T-sejt proliferáció vizsgálata: A proliferációs vizsgálatokhoz sejtmembrán permeábilis, fluoreszcens CFSE festékkel (Invitrogen) jelölt allogén naív CD4⁺ T-sejteket megfelelően előkezelt DC-kkel 1:20 arányban (DC: T-sejt arány) tenyésztettünk együtt anti-CD3 monoklonális antitest (DB Pharmingen) jelenlétében. A fluoreszcencia intenzitást 5 napos ko-kultivációt követően FACSCalibur citométerrel vizsgáltuk, az adatok kiértékelése FlowJo szoftver segítségével történt.

T-sejt polarizáció vizsgálata: Az intakt pollenszemekkel kezelt DC-k T-sejt-polarizáló hatását megvizsgáltuk parlagfű allergiás és nem allergiás egyénekből származó sejtek esetében is. A vizsgálatokhoz 3-3 donorból izoláltunk monocitákat és naív CD4⁺ T-sejteket. Az allergiás-nem allergiás csoportba sorolás a szérumok parlagfű-specifikus IgE és a total IgE koncentrációja alapján történt. A pollenkezelt, monocita eredetű DC-kezt autológ naív T-sejtekkel tenyésztettük együtt 4 napig, 1:10 arányban. Ezt követően a T-sejteket elválasztottuk a DC-ktől és 24 órán keresztül anti-CD3 antitestekkel reaktiváltuk. A T-sejtek által termelt citokineket a sejtkultúrák felülúszójából határoztuk meg.

T-sejt polarizáció meghatározása ELISPOT módszerrel: Egyes kísérletekben a megfelelően előkezelt DC-kkel történő aktiválást követően a T-sejtek citokin válaszát IFN- γ -, IL-4-, illetve IL-17-specifikus ELISPOT kitékkel (mind az eBioscience-től) detektáltuk. Kísérleteinkhez előaktivált DC és allogén CD3⁺ pan-T-sejt (1:10) ko-kultúrákat hoztunk létre, majd 4 napos inkubációt követően a CD3⁺ pan-T-sejteket a detektálandó citokinre specifikus antitesttel fedett ELISPOT lemezekre vittük fel. 24 vagy 48 órás inkubálást követően a sejteket mosással eltávolítottuk, majd a lemezeket biotinált detektor antitesttel inkubáltuk. Ezt követte a torna-peroxidáz-streptavidin konjugátum, illetve az enzim szubsztrátjának (3-amino-9-ethylcarbazol) hozzáadása a lemezekhez. A színes spotok detektálása ImmunoScan analizátorral történt, ImmunoSpot 4.0 szoftver (C.T.L.-Cellular Technology Ltd.) segítségével.

Intracelluláris citokin meghatározás áramlási citométerrel: A T-sejt polarizációs kísérletekhez megfelelő módon előkezelt DC-eket ko-kultiváltunk autológ CD4⁺CD45RA⁺ naív T-sejtekkel 1:10 arányban humán CD3 monoklonális antitest (BD Pharmingen) jelenlétében, majd 6 napos ko-kultivációt követően intracelluláris festéssel vizsgáltuk a T-sejtek citokin termelését. A 6. napot követően a T-sejteket poliklonális aktivátorokkal (anti-humán CD3 antitest, PMA, ionomycin) 7 órán keresztül reaktiváltuk. Az aktiválás utolsó 5 órájában a sejtekhez GolgiStop (BD Biosciences) fehérje transzport gátlót adtunk. Fixálást és permeabilizálást követően a T-sejteket IFN- γ - és IL-4-specifikus, fluoreszcens festékekkel konjugált monoklonális antitest koktéllal (BD Biosciences) jelöltük. Más kísérletekben anti-CD25 antitesteket használtunk a T-sejtek membránjának jelöléséhez, majd fixálást és permeabilizálást követően a sejteket Foxp3- (eBioscience) és IL-10-specifikus (Miltenyi Biotec), fluoreszcens festékekkel konjugált monoklonális antitestekkel jelöltük. A fluoreszcencia intenzitást FACSCalibur citométerrel vizsgáltuk, az adatok kiértékelése FlowJo szoftver segítségével történt.

Mitokondriális oxidatív stressz generálása és detektálása: Humán HL60 és egér SP2/0-Ag14 sejteket MitoSox Red festékkel, egy specifikus mitokondriális ROS-indikátorral, töltöttünk fel, majd antimycin A-val kezeltük. A MitoSox Red fluoreszcencia változást FACS Calibur áramlási citométerrel detektáltuk. A sejtek életképességét 7-AAD festék segítségével vizsgáltuk. Az adatok kiértékelése FlowJo szoftver (TreeStar) segítségével történt.

Mitokondriális DNS izolálása: A kezeletlen, illetve antimycin A-val kezelt humán HL60 és egér SP2/0-Ag14 sejtekből a natív, illetve oxidatív módon módosított mtDNS-t, a kereskedelembe kapható mtDNS izoláló kit (BioVision) segítségével nyertük ki. Az izolált és tisztított mtDNS mennyiségét NanoDrop spektrofotométer (Thermo Scientific) segítségével határoztuk meg.

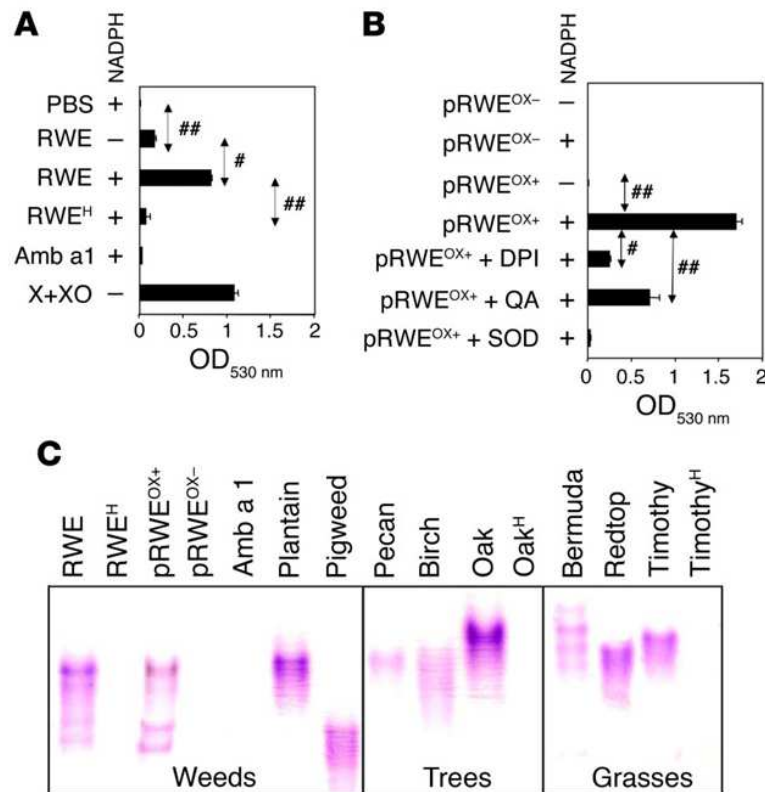
Izolált mtDNS oxidáltsági állapotának meghatározása dot blot módszerrel: Az mtDNS-ek oxidáltsági állapotát 8-oxoG-specifikus antitest (Millipore) segítségével, szemi-kvantitatív fehérje analízisre alkalmas dot blot módszerrel állapítottuk meg. A detektálás kemilumineszcens módszer segítségével (SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate; Thermo Scientific) fényérzékeny film felhasználásával történt. A dot-ok denzitását Kodak 1D Image Analysis 3.6-os verziójú szoftver (Kodak Digital Science Imaging, Eastman Kodak Company) segítségével határoztuk meg.

Statisztikai analízis: Az adatok átlag $\pm$ SE vagy átlag $\pm$ SEM formájában ábrázoltuk. Más esetekben olyan reprezentatív kísérleti eredményt mutattunk be, amit több hasonló eredményű kísérletből választottunk ki.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

5.1. A pollen NADPH oxidázok által termelt szabadgyökök hozzájárulnak az allergiás légúti gyulladás kialakulásához

Az oxigén eredetű szabadgyököket termelő NADPH oxidázok nemcsak az emlősök fagocitáiban működnek, hanem különböző növényi sejtekben is. Olyan létfontosságú funkciók szabályozásában játszanak szerepet, mint például a csírázás, vagy a gyökérszőrök növekedése [194, 195]. A gyökérszőrökhöz hasonlóan a pollentömlő kifejllesztése is csúcsi (apikális) növekedés eredménye, ezért feltételeztük, hogy a NADPH oxidázok a pollenszemekben is jelen vannak. Első kísérletünkben NBT esszét alkalmaztunk annak vizsgálatára, hogy a parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia*) pollenből származó kivonatban (ragweed pollen extract, RWE) kimutatható-e $O_2^{\bullet-}$ termelődése. Amikor a RWE-hoz NBT oldatot adtunk, lilás-kékes formazán kristályok képződése volt megfigyelhető (**5. A ábra**), ami fokozódott NADPH hozzáadásával. A hőkezelt (72°C , 30 perc) RWE (RWE^H) és Amb a 1, a RWE egyik legfontosabb allergén tulajdonságú fehérjéje, nem redukálta a NBT-ot. Annak érdekében, hogy azonosítsuk a NBT-redukáló komponensét a pollen kivonatnak, az összetevőit Superdex 200 kromatográfiás oszlopon frakcionáltuk. Az eljárás során kapott 120 tisztított RWE (pRWE) frakciót NBT esszével teszteltük NADPH jelenlétében. Az NBT pozitív frakciókat ($\text{pRWE}^{\text{OX}+}$) és az NBT negatív frakciókat ($\text{pRWE}^{\text{OX}-}$) külön-külön összegyűjtöttük és felhasználásig -80°C -on tároltuk. A $\text{pRWE}^{\text{OX}+}$ NBT-redukáló képessége gátlható volt SOD enzim hozzáadásával, valamint difenilén-jodónium (DPI) és quinankrin (QA) NADPH oxidáz inhibitorokkal (**5. B ábra**), ami $O_2^{\bullet-}$ -t termelő NADPH oxidáz enzim jelenlétére utalt [196]. Feltételezésünk megerősítésére *in situ* NBT esszét alkalmaztunk, amihez a pollen kivonat fehérjéit nem-denaturáló PAGE segítségével választottuk el egymástól. Miután a reakció pufferhez NADPH-ot adtunk, a gélben jól látható NBT-redukáló sávok jelentek meg, nemcsak a RWE hanem más pollen kivonatok esetében is (**5. C ábra**). Az összes vizsgált pollen kivonat esetében a hőkezelése megszüntette a NBT-redukáló aktivitást (**5. C ábra**). A ROS-termelő aktivitást a parlagfű pollen mellett 38 egyéb gyom, fű- és fafaj pollenjének kivonatában is ki tudtuk mutatni. A tesztek során csupán egy fenyőfaj esetében nem sikerült ROS termelését detektálni a pollen kivonatban (az adatokat nem mutatom). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a humán légúti allergiás reakciók kiváltásában jelentős szerepet játszó gyomok, fű- és fajok pollenjében jelen vannak a NADPH oxidázok. Egy másik munkacsoport később kimutatta, hogy ezeknek az enzimeknek a lokalizációja és aktivitása a különböző növényi családokban eltérő lehet [197].

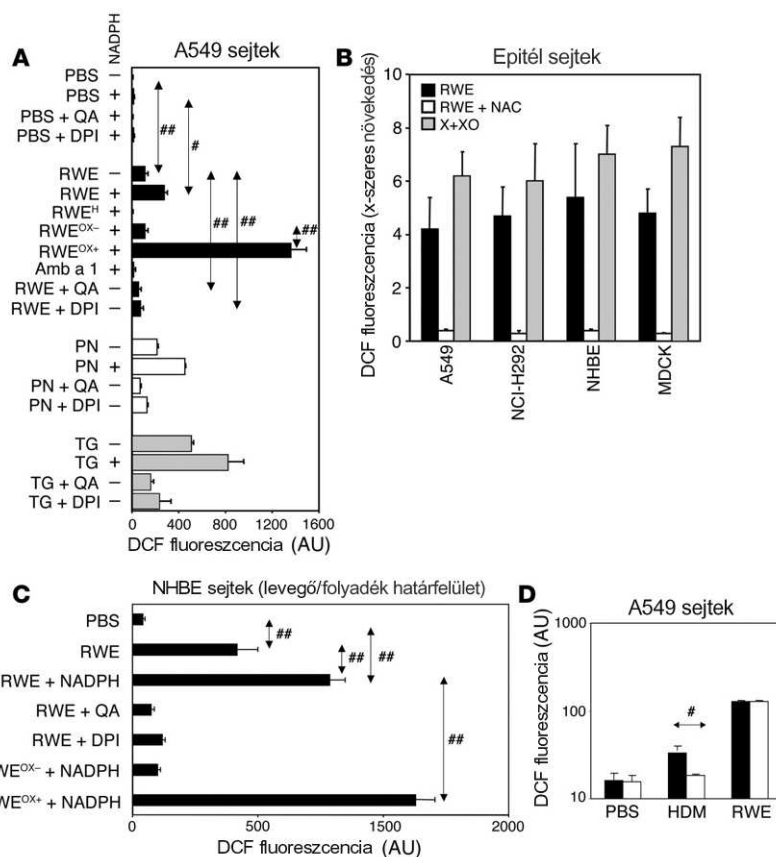


5. ábra. A pollen kivonatok NADPH oxidáz aktivitással rendelkeznek

(A) A parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen kivonat (RWE), a hőkezelt RWE (RWE^H) és az Amb a 1 allergén nitro-blue tetrazolium (NBT)-redukáló képességének vizsgálata NADPH jelenlétében (+) vagy hiányában (-). Xantint+xantin oxidázt (X+XO), egy O₂^{•-}-t generáló szubsztrát-enzim rendszert alkalmaztunk pozitív kontrollként. (B) A NBT-pozitív RWE frakciók (pRWE^{OX+}) által indukált formazán képződést gátolják a NADPH oxidáz inhibitorok /difenilén-jodónium (DPI) és quinankrin (QA)/, valamint a szuperoxid dizmutáz (SOD). (C) Pollen kivonatok általi NBT redukció nem-denaturáló PAGE után. Plantain: lándzsás útifű (*Plantago major*); Pigweed: szőrös disznóparéj (*Amaranthus retroflexus*); Pecan: pekándió (*Carya illinoensis*); Birch: közönséges nyír (*Betula pendula*); Oak: tölgy (*Quercus* sp.); Bermuda: csillagpázsit (*Cynodon dactylon*); Redtop: fehér tippán (*Agrostis alba*); Timothy: mezei komócsin (*Phleum pratense*). RWE^H, Oak^H és Timothy^H: hőkezelt (72°C, 30 perc) pollen kivatok. #P < 0,001; ##P < 0,0001.

A következő kísérletekben megvizsgáltuk, hogy a pollen kivatok NADPH oxidázai által termelt O₂^{•-} hogyan hat tenyésztett hámsejtekre. A vizsgálathoz először bronchiális epitél A549 sejteket redox-szenzitív H₂DCF-DA festékkel töltöttünk meg, majd különböző pollen kivatokkal kezeltünk. A parlagfű, a pekándió és a mezei komócsin pollen kivatok

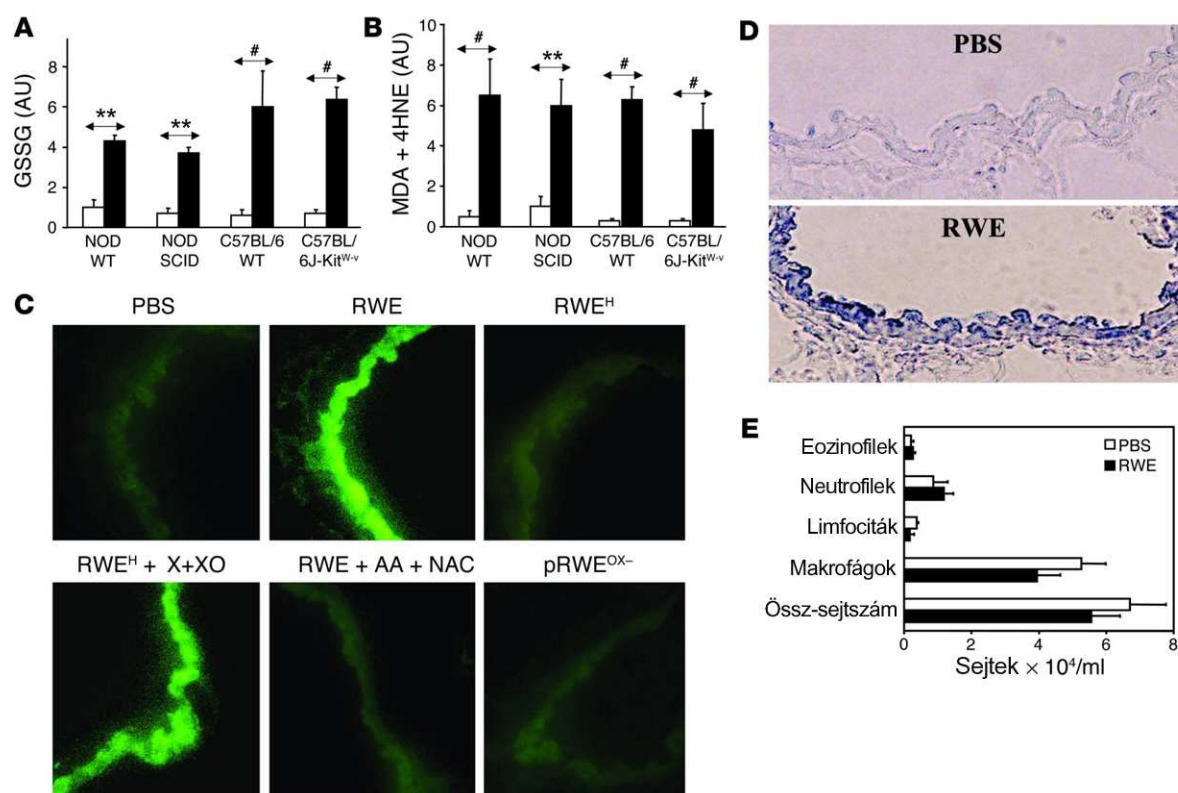
hatására a H_2DCF gyorsan átalakult a fluoreszcens diklorofluoreszceinné DCF formává (6. A ábra). A pollen kivonatokhoz adott NADPH tovább növelte az intracelluláris ROS szintjét, QA vagy DPI jelenlétében viszont szignifikánsan alacsonyabb DCF jel volt detektálható. A RWE^H , az Amb a 1 vagy a $pRWE^{OX-}$ kezelések nem növelték az intracelluláris ROS mennyiségét, ellentétben az aktív NADPH oxidázt tartalmazó $pRWE^{OX+}$ -kal történő kezelésekkel (6. A ábra).



6. ábra. A RWE kezelés hatására emelkedik a ROS szintje tenyésztett epitél sejtekben
 (A) NADPH oxidáz inhibitorok hatása a pollen kivonat kezelés által indukált ROS-szint emelkedésre A549 sejtekben. QA: quinankrin; DPI: difenilén-jodónium; RWE: parlagfű pollen kivonat; RWE^H : hőkezelt RWE; $pRWE^{OX+}$: NBT-pozitív RWE frakciók; $pRWE^{OX-}$: NBT-negatív RWE frakciók; PN: pekándió pollen kivonat; TG: mezei komócsin pollen kivonat. (B) RWE által indukált ROS különböző epitél sejtekben. NAC: N-acetil-cisztein; X+XO: xantin+xantin oxidáz. (C) NADPH oxidáz inhibitorok hatása RWE kezelés által indukált ROS-termelésre levegő-folyadék fázishatáron növesztett NHBE sejtekben. (D) Proteáz inhibitorok hatása házi poratka (HDM) kivonat és RWE által indukált ROS szintjére A549 sejtekben. Proteáz inhibitor jelenlétében (□) és hiányában (■) kezelt sejtek. $\#P < 0,001$; $\##P < 0,0001$.

A RWE hasonlóan hatékonynak bizonyult, mint a $O_2^{\bullet-}$ -t termelő xantin + xantin oxidáz (X+XO) rendszer az intracelluláris ROS szintjének növelésében tüdőből származó epitél sejtek (NCI-H292), normál humán bronchiális epitél sejtek (NHBE), valamint Madin Darby kutya vese (MDCK) epitél sejtek esetében (**6. B ábra**). Az intracelluláris ROS mennyiségének növekedése gátolható volt, amennyiben a sejteket előkezeltük NAC antioxidánsal (**6. B ábra**). A RWE kezelés hatására a levegő-folyadék határfelületen növesztett NHBE sejtekben is megemelkedett az intracelluláris ROS szintje (**6. C ábra**), ami QA és DPI hozzáadásával gátolható volt. A levegő-folyadék határfelületen növesztett NHBE sejtekhez adott $pRWE^{OX+}$ szintén fokozta az intracelluláris ROS mennyiségét, a $pRWE^{OX-}$ viszont nem volt képes a ROS szintjének növelésére (**6. C ábra**). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a RWE és a $pRWE^{OX+}$ képesek voltak oxidatív stresszt indukálni a fiziológiailag releváns körülmények között növesztett NHBE sejtekben is. Előzetes tanulmányokból kiderült, hogy mind a RWE [198], mind a házi poratka (house dust mite, HDM) kivonat rendelkezik proteáz aktivitással [199]. A korábbi vizsgálatok eredményeivel megegyezően, melyek azt mutatták, hogy a proteázok képesek oxidatív stresszt indukálni légúti epitél sejtekben [200], az A549 sejtekhez adott HDM kivonat is ROS képződését indukálta, és a jelenség proteáz inhibitor-koktéllal gátolható volt. Ezzel ellentétben a RWE által indukált ROS-szint emelkedés nem volt gátolható proteáz inhibitorokkal (**6. D ábra**). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a pollen kivonatok NADPH oxidáz és nem a proteáz aktivitása felelős az intracelluláris ROS indukálásáért a tenyésztett epitél sejtekben.

A következő megválaszolandó kérdésünk az volt, hogy vajon a pollen kivonatok képesek-e oxidatív stresszt indukálni a légutakban a gyulladásos sejtek beáramlását megelőzően. A kérdés megválaszolásához az allergiás légúti gyulladásnak egy olyan egér modelljét használtuk, amelyben az állatokat intraperitoneálisan szenzitivizáljuk, és egyetlen intranazális allergén kezeléssel váltjuk ki a gyulladást. A szenzitivizált egerek intranazális RWE kezelése megemelte az oxidatív stressz markerek (GSSG, MDA és 4-HNE) szintjét a BALF mintákban már 30 perccel az expozíciót követően (**7. A és B ábra**). A RWE kezelés 15 percen belül az intracelluláris ROS mennyiségének növekedését indukálta a légúti epitéliumban (**7. C és D ábra**), ezzel szemben a NADPH oxidáz aktivitással nem rendelkező RWE^H és $pRWE^{OX-}$ nem emelték meg a ROS szintjét (**7. C ábra**). Amikor X+XO-t adtunk együtt RWE^H -tal, a ROS-növekedés újra detektálható volt (**7. C ábra**). Antioxidánsok (AA és NAC) hozzáadása meggátolta, hogy a RWE kezelés a ROS-szintek növekedését indukálja a tüdő epitéliumban (**7. C ábra**). A szenzitivizált egerek légútjaiban nem voltak kimutathatóak a gyulladásos sejtek még 1 órával a RWE expozíció után sem, ami arra utal, hogy az általunk detektált oxidatív stressz megelőzi a gyulladásos sejtek infiltrációját (**7. E ábra**).



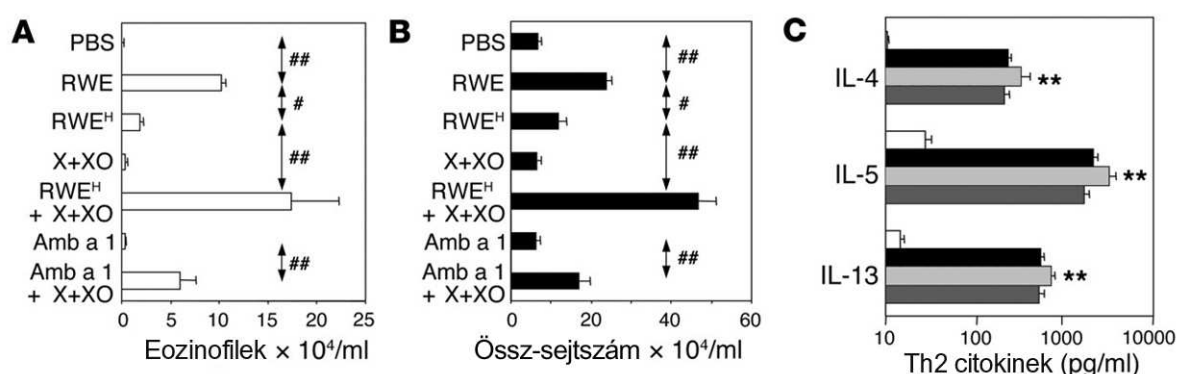
7. ábra. A RWE kezelés oxidatív stresszt okoz a tüdőben a gyulladásos sejtek beáramlása előtt

(A és B) A RWE kezelés hatása az oxidatív stressz markerek /oxidált glutation (GSSG) (A), malondialdehid (MDA), és 4-hidroxinonenal (4-HNE) (B)/ szintjére a légúti hámsejteket borító folyadékfilmben. WT: vad típusú egerek; NOD SCID: B-sejt, T-sejt és Ig deficiens egerek; C57BL/6J-Kit^{W-v}: hízósejt deficiens egerek; AU: tetszőleges egység. PBS- (□) és RWE- (■) kezelt egerek ($n = 4-6$ egér /csoport). Az eredményeket átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk. ** $P < 0,01$; # $P < 0,001$. (C és D) A ROS-szintek változásának követése az egerek tüdő epitéliumában ex vivo kezelés után DCF fluoreszcencia (C) vagy NBT redukció (D) detektálásával. Nagyítás: 100x. RWE: parlagfű pollen kivonat; RWE^H: hőkezelt RWE; pRWE^{OX-}: NBT-negatív RWE frakciók; X+XO: xantin+xantin oxidáz; NAC: N-acetil-cisztein; AA, aszkorbinsav. (E) A RWE kezelés után 1 órával a gyulladásos sejtek infiltrációja még nem mutatható ki a szenitizált egerek légútjaiban. PBS- (□) és RWE- (■) kezelt egerek ($n = 6$ egér /csoport).

A korábbi feltételezés az volt, hogy az allergiás gyulladás során az immunrendszer sejtjei az elsődleges okozói a légutakban kialakuló oxidatív stressznek, ezért megvizsgáltuk a RWE kezelés hatását hízósejt deficiens (C57BL/6J-Kit^{W-v}), valamint B-sejt, T-sejt és Ig deficiens egerekben (NOD SCID) is. A RWE expozíciót követően az oxidatív stressz

markerek (GSSG, MDA és 4-HNE) szintjében nem volt szignifikáns különbség a knock-out és a vad típusú (WT) egerek között (7. A és B ábra). A naív egerekben a RWE kezelés által indukált oxidatív stressz marker szintek hasonlóak voltak a szenzitizált egerekben kapottakhoz (az adatokat nem mutatom). Ezekből az adatokból arra következtethetünk, hogy a pollen NADPH oxidázok által a légutak epitéliumában és légutakat bevonó folyadékfilmben generált oxidatív stressz független az adaptív immunválasztól.

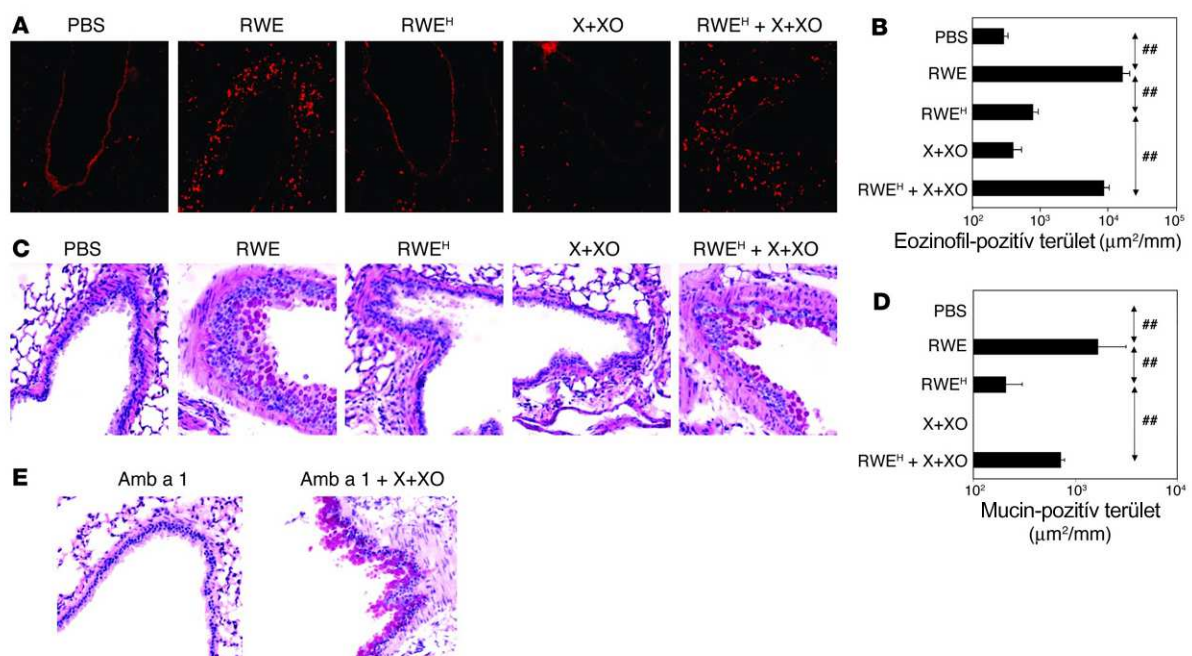
Ezt követően megvizsgáltuk a pollen NADPH oxidázok által generált ROS légúti gyulladásban betöltött szerepét. A várakozásnak megfelelően a RWE kezelés mind az eozinofil granulociták (8. A ábra), mind az összes gyulladásos sejt számát (8. B ábra) megnövelte a szenzitizált egerek légútjaiban. A RWE expozícióval összehasonlítva, a NADPH oxidáz aktivitástól mentes oldatokkal (RWE^H és Amb a 1) történő intranazális kezelés lényegesen kevesebb eozinofil és más gyulladásos sejt infiltrációját eredményezte a légutakba (8. A és B ábra).



8. ábra. A pollen NADPH oxidázok által indukált oxidatív stressz szerepet játszik az allergiás légúti gyulladás kialakulásában

(A és B) A NADPH oxidáz aktivitás mentes oldatokkal (RWE^H és Amb a 1) történő kezelés csak enyhe allergiás légúti gyulladást eredményez, míg a hozzáadott $\text{O}_2^{\bullet-}$ termelés (X+XO) visszaállítja/fokozza a RWE^H és Amb a 1 által indukált gyulladást a RWE által kiváltott szintre. RWE: parlagfű pollen kivonat; RWE^H: hőkezelt RWE; X+XO: xantin+xantin oxidáz. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk ($n = 7-9$ egér/csoport). (C) Th2 citokin szintek lépsejt tenyészetek felülúszójában. A RWE-tal szenzitizált egerekből származó lépsejteket PBS ($\square$), RWE ($\blacksquare$), RWE^H ($\blacksquare$) vagy Amb a 1 ($\blacksquare$) hozzáadása után 96 órán át tenyésztettük, majd a citokinek mennyiségét a felülúszókban ELISA-val határoztuk meg. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk ($n = 4-6$ egér/csoport). ** $P < 0,01$; # $P < 0,001$; ## $P < 0,0001$.

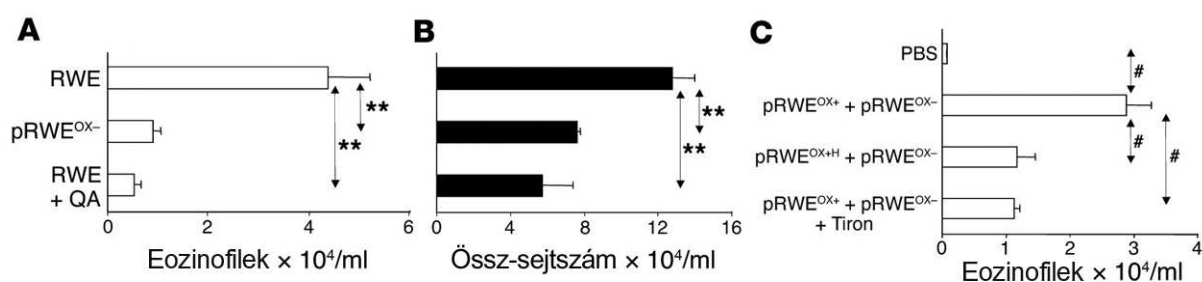
Felmerült annak a lehetősége, hogy a RWE^H és az Amb a 1 oldatok csökkent gyulladáskeltő képessége esetleg a kisebb fokú Th2 citokin (IL-4, IL-5, IL-13) indukáló kapacitásukra vezethető vissza. Ezt a lehetőséget azonban kizártuk, mivel a RWE^H és Amb a 1 által indukált Th2 citokinek szintje a szenitizált egerekből származó lépsejt tenyészetekben hasonló vagy magasabb volt, mint a RWE által indukált citokineké (8. C ábra). Az eozinofil granulociták és a mucin-tartalmú sejtek kvantitatív meghatározásához elvégeztük a kezelt egerek tüdőszöveteinek morfológiai analízisét. Hasonlóan a BALF minták analízise során kapott eredményekhez, a RWE^H kivonattal végzett intranazális kezelés lényegesen kevesebb eozinofil akkumulációját eredményezte a peribronchiális területeken (9. A és B ábra), a légúti epitéliumban pedig kevesebb mucin-tartalmú sejt kialakulásához vezetett (9. C és D ábra), a RWE expozícióval összehasonlítva.



9. ábra. A RWE NADPH oxidáz aktivitásának megszüntetése csökkenti az eozinofil granulociták akkumulációját a peribronchiális térben és a mucin-tartalmú sejtek számát a légúti epitéliumban

Az eozinofilek azonosítása a peribronchiális régiókban immunfluoreszcenciás módszerrel (A), a mucin-tartalmú sejtek kimutatása PAS festéssel a légúti epitéliumban (C), és kvantitatív meghatározásuk morfológiai elemzéssel (B és D). (E) A X+XO együttdadása az Amb a 1 allergénnel növeli a mucin-termelő sejtek számát a légúti epitéliumban. Nagyítás: 100x. RWE: parlagfű pollen kivonat; RWE^H: hőkezelt RWE; X+XO: xantin+xantin oxidáz. Az eredményeket átlag ± SEM formában ábrázoltuk (n = 3-6 egér/csoport). ##P < 0,0001.

Kísérleteink eredményei szerint a pollen NADPH oxidáz aktivitás $O_2^{\bullet-}$ keletkezéséhez vezet, ezért azt feltételeztük, ha egy másik, $O_2^{\bullet-}$ -t termelő rendszer adunk a RWE^H és az Amb a 1 oldatokhoz, az visszaállítja/fokozza az allergiás gyulladást kiváltó képességüket. Valóban, a X+XO ROS-generáló rendszer a RWE^H -tal együtt adva hasonló mértékű allergiás gyulladást (8. A és B; 9. A-D ábra) okozott, mint a RWE. Hasonló módon, az Amb a 1 együttadása a X+XO-zal szignifikánsan megnövelte a gyulladásos sejtek számát a BAL folyadékban (8. A és B ábra) és a mucin-tartalmú sejtek számát a légúti epitéliumban (9. E ábra). A X+XO önmagában azonban nem okozott sem gyulladást a tüdőkben (8. A és B; 9. A-D ábra), ami azt jelzi, hogy az oxidatív stressz önmagában nem elegendő a fentebb leírt hatások kiváltásához. A pollen NADPH oxidázok jelentőségének további bizonyításához az allergiás gyulladás kiváltásában, megvizsgáltuk a $pRWE^{OX-}$, valamint a RWE + QA kombinált kezelés hatását szenzitizált egerekre. A $pRWE^{OX-}$ kezelés jóval kevesebb eozinofil (10. A ábra) és más gyulladásos sejt (10. B ábra) beáramlását váltotta ki a légutakba, mint a RWE expozíció. A QA együttadása a RWE-tal szignifikánsan csökkentette az eozinofilek (10. A ábra) és más gyulladásos sejtek (10. C ábra) infiltrációját.

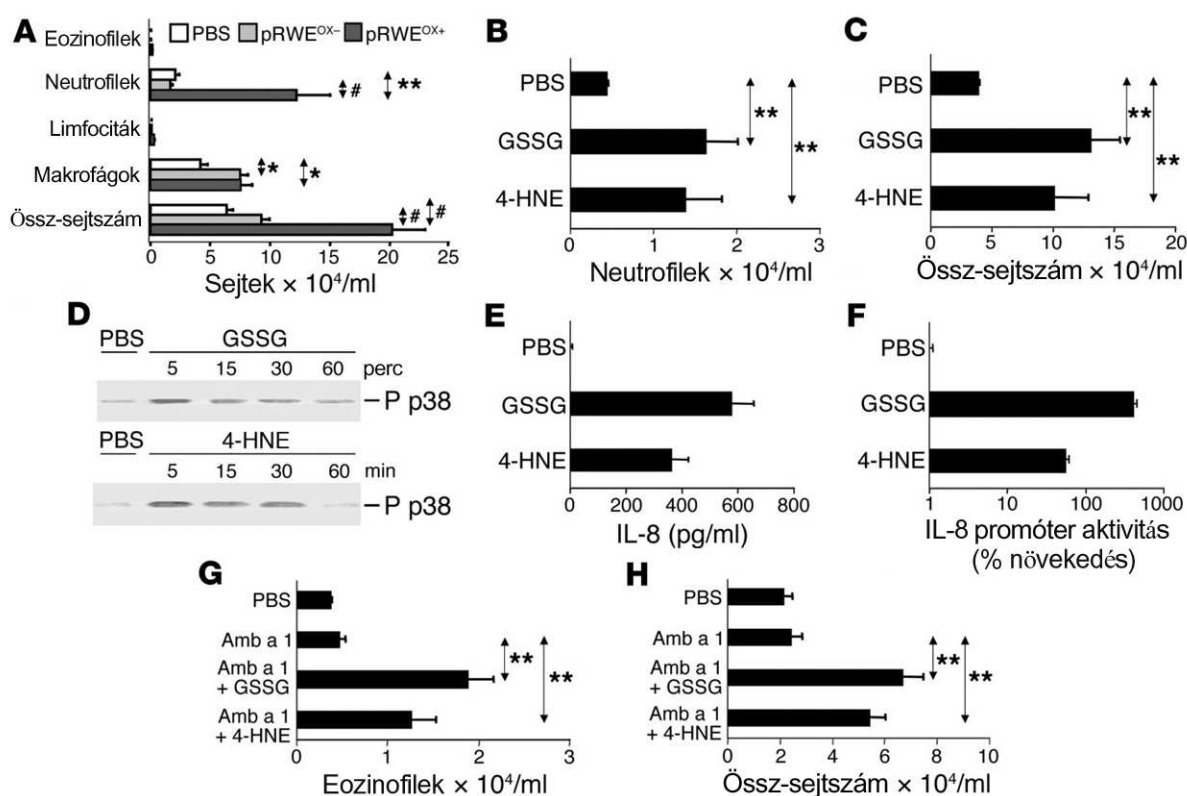


10. ábra. A RWE NADPH oxidáz aktivitásának eltávolítása, vagy az általa termelt ROS semlegesítése csökkenti az allergiás gyulladása intenzitását

RWE-szenzitizált egereket kezeltünk RWE-tal, $pRWE^{OX-}$ -kal, vagy RWE+QA-nal. Mind a $pRWE^{OX-}$, mind a RWE+QA kezelés szignifikánsan kevesebb eozinofil (A) és más gyulladásos sejt (B) beáramlását váltotta ki a légutakba, mint a RWE expozíció. (C) Az aktív NADPH oxidáz tartalmú frakciókkal ($pRWE^{OX+}$ plusz $pRWE^{OX-}$) való kezelés intenzív eozinofil infiltrációt indukál, míg az inaktív NADPH oxidáz frakciókkal ($pRWE^{OX+H}$ plusz $pRWE^{OX-}$, vagy $pRWE^{OX+}$ plusz $pRWE^{OX-}$ plusz Tiron) történő kezelés szignifikánsan kevesebb eozinofil beáramlást eredményez a RWE-szenzitizált állatok légútjaiba. RWE: parlagfű pollen kivonat; $pRWE^{OX+}$: NBT-pozitív RWE frakciók; $pRWE^{OX+H}$: hőinaktivált $pRWE^{OX+}$; $pRWE^{OX-}$: NBT-negatív RWE frakciók; QA: quinankrin. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk ($n = 5-7$ egér/csoport). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; # $P < 0,001$.

Összefoglalva, ezek az eredmények azt sugallják, hogy a RWE NADPH oxidáza által generált oxidatív stressz fokozza a gyulladásos sejtek beáramlását a légutakba és növeli a mucin-tartalmú sejtek számát a légúti epitéliumban, azaz felerősíti a pollen allergének által indukált allergiás gyulladást. Ennek a hipotézisnek a megerősítéséhez, RWE-szenzitizált egereknek kombinálva adtunk intranazálisan $\text{pRWE}^{\text{OX-}}$ -at és $\text{pRWE}^{\text{OX+}}$ -at, hogy biztosítsuk az allergének és a ROS-generáló aktivitás együttes jelenlétét. Két további vizsgálati csoportban „eltávolítottuk” a NADPH oxidáz aktivitást a kezeléshez használt anyagból, vagy a $\text{pRWE}^{\text{OX+}}$ hőinaktivációjával, vagy a 4,5-dihidroxi-1,3-benzén diszulfonsav (Tiron) együttes adásával, ami hatástalanítja a $\text{O}_2^{\bullet-}$ -t [201]. Az allergének és a ROS-generáló aktivitás kombinációja 2,5-3-szor több eozinofil granulocitát eredményezett a légutakban, mint az allergének önmagukban (**10. C ábra**).

Ismert, hogy azok az anyagok, amelyeknek a belélegzése oxidatív stresszt vált ki a légutakban (pl. ózon) neutrofil gyulladást okoznak [202]. Ebből kiindulva, összehasonlítottuk a $\text{pRWE}^{\text{OX-}}$ és a $\text{pRWE}^{\text{OX+}}$ neutrofil toborzó képességét naív egerekben. A $\text{pRWE}^{\text{OX+}}$ -kal kezelt egereknél 7-szer magasabb neutrofil akkumulációt tapasztaltunk 24 órával az expozíció után, mint a $\text{pRWE}^{\text{OX-}}$ -kal kezeltéknél (**11. A ábra**). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a pollen NADPH oxidázok által indukált oxidatív stressz neutrofil granulociták infiltrációját váltja ki a tüdőben az adaptív immunválaszoktól függetlenül. Megfigyeléseink szerint a pollen kivonattal történő kezelés egyik meghatározó következménye a GSSG és a 4-HNE keletkezése a légúti folyadékfilmben (**7. A és B ábra**), ezért megvizsgáltuk ezeknek az oxidatív stressz termékeknek a szerepét a neutrofilek toborzásában. Az egerek nem toxikus koncentrációjú GSSG-nal és 4-HNE-lal történő kezelése 3-4-szer nagyobb neutrofil és más gyulladásos sejt akkumulációt eredményezett, mint a PBS kezelés (**11. B és C ábra**). Az A549 sejtenyészethez adott GSSG és 4-HNE a p38 MAPK gyors (5 percen belüli) tirozin foszforilációját eredményezte (**11. D ábra**), amit IL-8 (**11. E ábra**) termelődés követett. A GSSG és a 4-HNE kezelés hatását az IL-8 promóterére IL-8/luciferáz esszé segítségével vizsgáltuk [203]. A GSSG kezelés 400-szoros, míg a 4-HNE kezelés 58-szoros növekedést indukált az IL-8 promóter aktivitásában (**11. F ábra**). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a p38 MAPK aktivációja és az IL-8 (illetve annak egér megfelelőjének) a termelődése nagy valószínűséggel szerepet játszik a GSSG, illetve 4-HNE által indukált neutrofil akkumulációban. A következőkben megvizsgáltuk a GSSG és 4-HNE szerepét az allergiás légúti gyulladásban. Az Amb a 1 allergénnel kezelt RWE-szenzitizált egerekben nem emelkedett sem az eozinofil, sem más gyulladásos sejtek száma a tüdőben (**11. G és H ábra**). Amikor az Amb a 1 allergénhez GSSG-t vagy 4-HNE-t adtunk a kezelés során, a légutakba beáramló eozinofilek száma 3-4-szeresére, míg az összes gyulladásos sejtszám 2-3-szorosára növekedett (**11. G és H ábra**).



11. ábra. A pollen NADPH oxidázok által generált oxidatív stressz és a kialakuló GSSG és 4-HNE hatása az allergiás légúti gyulladásra

(A) A naív egerek pRWE^{OX+}-kal és pRWE^{OX-}-kal történő kezelése gyulladásos sejtek beáramlását indukálta a légutakba 24 órával a kezelés után. (B és C) A GSSG és a 4-HNE kezelés hatása neutrofilek (B) és más gyulladásos sejtek (C) infiltrációjára naív egerekben 24 órával a kezelés után. (D) A GSSG és a 4-HNE kezelés a p38 MAPK tirozin foszforilációját idézi elő tenyésztett A549 sejtekben. (E és F) A GSSG és a 4-HNE kezelés IL-8 termelődést (E) és az IL-8 promóter aktivitásának növekedését (F) váltja ki A549 sejtekben. (G és H) Az Amb a 1 önmagában nem, csak GSSG vagy 4-HNE hozzáadásával indukálja az eozinofilek (G), és más gyulladásos sejtek (H) légutakba áramlását RWE-szenzitizált egerekben. pRWE^{OX+}: NBT-pozitív RWE frakciók; pRWE^{OX-}: NBT-negatív RWE frakciók; GSSG: oxidált glutation; 4-HNE: 4-hidroxinonenal. Az eredményeket átlag ± SEM formában ábrázoltuk (n = 4-6 egér /csoport). *P < 0,05; **P < 0,01; ##P < 0,001.

Korábbi vizsgálatok szerint allergén és az erős oxidáns tulajdonsággal rendelkező ózon kombinációjával történő kezelés fokozza az allergiás gyulladást [57, 204]. Ezekben a kísérletekben egy környezeti faktor, az ózon, váltotta ki az oxidatív stresszt a légutakban. Jelen kísérleteinkben sikerült egy új környezeti tényezőt azonosítanunk, amely szintén oxidatív folyamatokat indít el a légutakban. Elsőként mutattuk ki, hogy a pollen kivonatok oxidáns aktivitással rendelkeznek. Feltártuk, hogy az oxidáns aktivitás pollen NADPH oxidáz

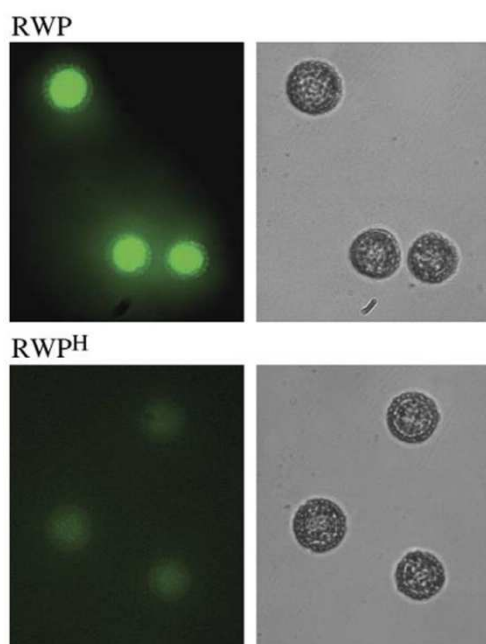
enzimek működésének az eredménye. Ezek az enzimek a fagociták NADPH oxidáz enzimeihez hasonlóan $O_2^{\bullet -}$ termelésére képesek. A pollen NADPH oxidázok által termelt szabadgyökök percekben belül oxidatív stresszt okoznak a légutak hámsejtjeiben. Hízósejt-, T-sejt-, illetve B-sejt-deficiens egereken végzett kísérletekkel igazoltuk, hogy ez a hatás független az adaptív immunválaszoktól. Ha gátoltuk a pollen eredetű ROS termelődését, vagy eltávolítottuk a pollen kivonatból a NADPH oxidázokat, drámai módon csökkent az eozinofíliás gyulladás a pollen kivonatokkal kezelt egerek légútjaiban.

Megfigyeléseink alapján, ahhoz hogy a szenzitizált egerekben súlyos allergiás gyulladás alakuljon ki kétféle szignál együttes jelenléte szükséges. Az egyik szignál természetesen maga az allergén. A második szignált a pollen NADPH oxidázok által indukált oxidatív stressz hozza létre. Eredményeink szerint ebben az oxidatív stressz-generált szignálban fontos szerepet tölthet be a GSSG és a 4-HNE. Pusztán ezekkel a komponensekkel intranazálisan kezelve az egereket neutrofil granulociták légutakba áramlását lehet kiváltani. Amikor tenyésztett légúti hámsejtekhez GSSG-t és 4-HNE-t adtunk IL-8, az egyik legfontosabb neutrofil kemotaktikus faktor, termelődését és a p38 MAPK útvonal aktiválódását detektáltuk. Összességében eredményeink azt jelzik, hogy a pollen NADPH oxidázok által generált oxidatív stressz a légutakban, valamint az annak következményeként kialakuló GSSG és 4-HNE fontos szerepet tölthetnek be az allergiás légúti gyulladások kialakulásában.

Egy évvel a publikációnk megjelenése után egy cseh munkacsoport kimutatta, hogy a feltételezésünknek megfelelően, valóban NADPH oxidázok irányítják a pollentömlők apikális növekedését. DPI jelenlétében, vagy az enzim kifejeződésének gátlásakor a pollentömlő növekedése lelassult. Kívülről hozzáadott H_2O_2 a pollentömlő növekedését felgyorsította [205].

5.2. A pollen eredetű oxidatív stressz hatása az azonnali túlérzékenységi reakciókra és a késői fázisú gyulladásos válaszra az allergiás kötőhártyagyulladás egér modelljében

Az előző vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a klinikumban az allergiás bőrtesztekhez (Prick-teszt) használt pollen kivonatok NADPH oxidáz aktivitással rendelkeznek. Ebben a kísérletsorozatban az intakt pollenszemek ROS-termelő képességét tanulmányoztuk. Először az egyik legfontosabb szezonális légúti allergént, a parlagfű pollent teszteltük. A hidratált parlagfű pollenszemek (ragweed pollen grains, RWP) a redox-érzékeny H_2DCF -t fluoreszcens DCF-né alakították át, ezzel szemben a hőkezelt ($72^\circ C$, 30 perc) RWP (RWP^H) nem volt képes erre (**12. ábra**).



12. ábra. A hidratált parlagfű pollenszemek (RWP) ROS termelésre képesek

Bal oldali képek: a hidratált RWP és a hőkezelt RWP (RWP^H) DCF fluoreszcenciája mikroszkópos felvételen. A jobb oldali képek: a pollenszemek fáziskontraszt képei. Nagyítás: 100x. A képek 3 független kísérletet reprezentálnak.

A H_2DCF különböző típusú reaktív oxigén származékokkal is reakcióba léphet [206]. Annak érdekében, hogy meghatározzuk milyen típusú ROS termelődik elsődlegesen pollen hidratációt követően, NBT esszét végeztünk. A RWP dóziszfüggő módon formazánná redukálta a NBT-ot, ami $O_2^{\bullet -}$ keletkezésére utalt. Az NBT esszé segítségével megvizsgáltuk további 42 növényfaj - néhányat a **13. A ábra** mutat be - pollenszemeinek ROS termelését. A

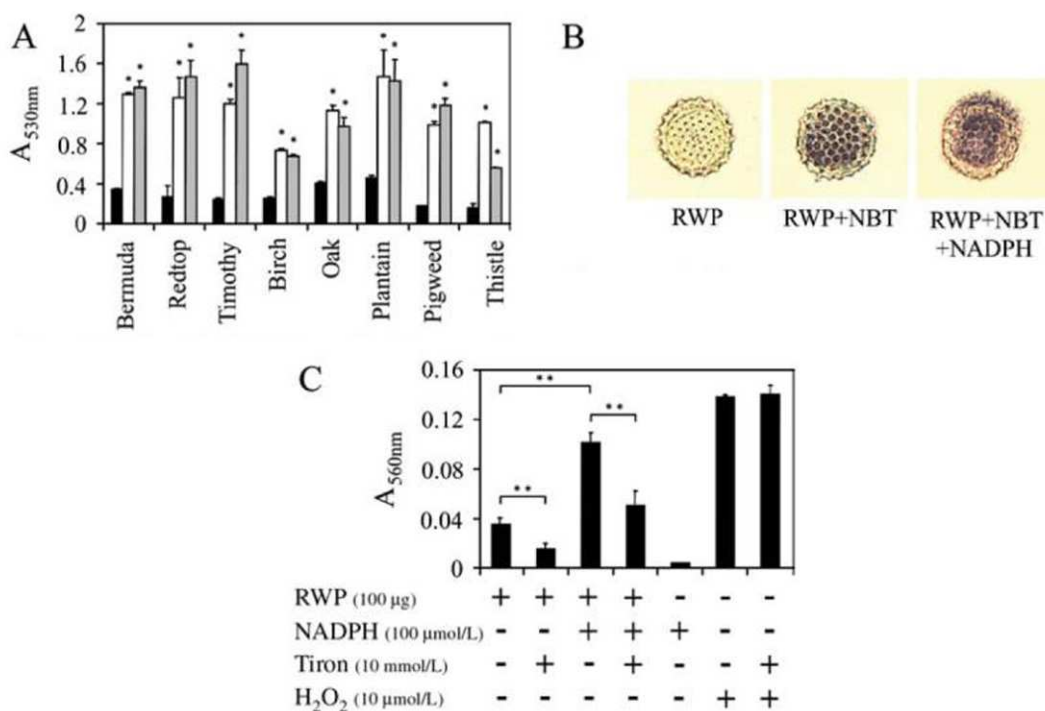
hidratált pollenszemek felszínén a NBT hozzáadását követően formazán képződés volt megfigyelhető az összes vizsgált növényfaj esetében. A képződő formazán mennyisége szignifikánsan fokozódott NADPH, sőt NADH jelenlétében is (**13. A és B ábra**), ugyanakkor sem a NADPH, sem a NADH önmagában nem reagált a NBT-mal (az adatokat nem mutatom). Ez azt mutatja, hogy a $O_2^{\bullet-}$ -termelő pollen oxidázok NADPH-ot és NADH-ot is képesek szubsztrátként használni, szemben a fagociták oxidázaival, amelyek szinte kizárólag NADPH felhasználásával termelnek $O_2^{\bullet-}$ -t [207]. Az RWP előkezelése Tironnal, vagy SOD-zal jelentősen csökkentette a formazán keletkezését (**I. Táblázat**). A pollenszemek általi NBT redukció gátolható volt DPI és QA NADPH oxidáz inhibitorokkal, míg a növényi peroxidázok inhibitoraként használatos aziddal nem [207-209], ami megerősíti, hogy NAD(P)H oxidázok állnak a pollenszemek ROS termelésének hátterében. Az $O_2^{\bullet-}$ gyorsan átalakul H_2O_2 -dá akár nem-enzimatis úton, akár SOD jelenlétében [210, 211], és a pollenszemekről már korábban kimutatták, hogy tartalmazznak SOD-t [211]. Ebből kiindulva, a következő kísérletben nem az elsődlegesen termelődő $O_2^{\bullet-}$ -t, hanem a belőle kialakuló H_2O_2 -t próbáltuk kimutatni Amplex Red esszé alkalmazásával [212]. A RWP szuszpenzióban kimutatható volt H_2O_2 , és a mennyisége tovább növelhető volt NADH vagy NADPH hozzáadásával (**13. C ábra**). A H_2O_2 keletkezése gátolható volt, ha a RWP-t Tironnal kezeltük elő (**13. C ábra**). Hasonló eredményeket figyeltünk meg más gymnomvények, fű- és fafélék pollenszuszenziói esetében is (az adatokat nem mutatom). A fenti megfigyelések alapján a pollenszemekben található NAD(P)H oxidázok $O_2^{\bullet-}$ -t állítanak elő, amelyet szintén a pollenben található SOD tovább alakíthat H_2O_2 -dá.

I. Táblázat. A parlagfű pollenszemek szuperoxid anion termelése

Inhibitorok	Formazán képződés ($A_{530\text{ nm}} \pm \text{SD}$)	
	Alapszint	+NADH (100 $\mu\text{mol/L}$)
–	0.119 ± 0.017 (100%)	0.776 ± 0.045 (100%)
Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$)	0.107 ± 0.016 (90%)	0.713 ± 0.017 (92%)
Tiron (1 mmol/L)	0.059 ± 0.011 (50%)**	0.481 ± 0.034 (62%)**
Tiron (10 mmol/L)	0.043 ± 0.004 (36%)**	0.263 ± 0.005 (34%)**
SOD (50 U/mL)	0.085 ± 0.006 (71%)*	0.541 ± 0.044 (70%)*
Quinacrin (5 mmol/L)	0.089 ± 0.014 (75%)*	0.495 ± 0.003 (64%)**
Difenilén-jodónium (100 $\mu\text{mol/L}$)	0.061 ± 0.011 (51%)**	0.425 ± 0.019 (55%)**
NaN_3 (10 mmol/L)	0.122 ± 0.013 (102%)	0.807 ± 0.024 (104%)
NADPH (100 $\mu\text{mol/L}$)	0.538 ± 0.029 (452%****)	—

* $P < .05$; ** $P < .01$; **** $P < .0001$ vs kontroll.

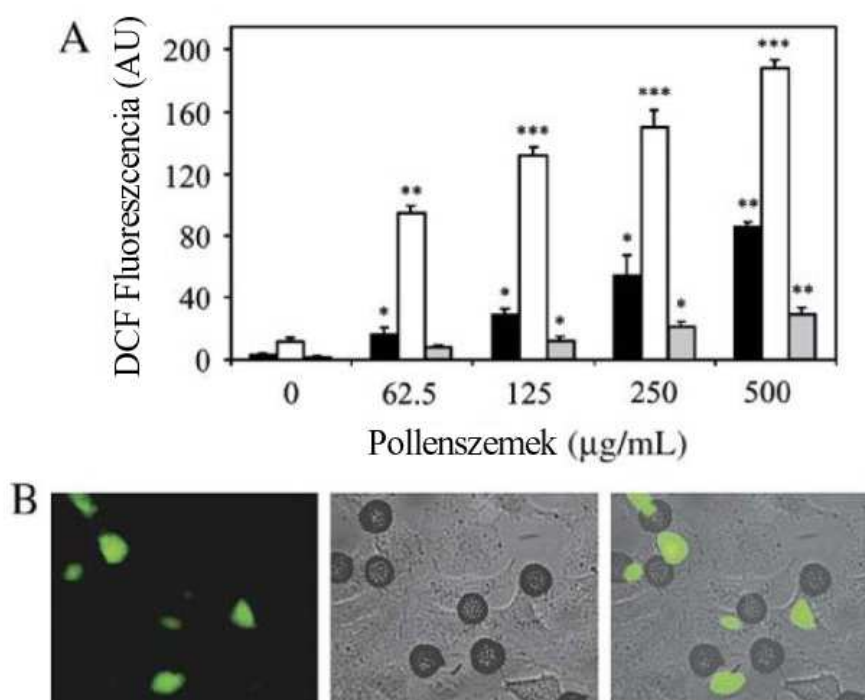
A következőkben megvizsgáltuk, hogy a hidratált pollenszemek NAD(P)H oxidázai által termelt $O_2^{\bullet-}$ -nak van-e hatása az intracelluláris ROS szintjére NHBE és A549 sejtekben. Ehhez a sejteket $H_2\text{DCF-DA}$ -tal töltöttük meg, és a DCF fluoreszcencia változását fluoriméter vagy fluoreszcens mikroszkóp segítségével detektáltuk.



13. ábra. A különböző pollenszemek általi szuperoxid anion termelés

(A) A nitro-blue tetrazolium (NBT) formazánná redukálása különböző fajok pollenszemai által. ■: pollenszem szuszpenzió; □, pollenszem szuszpenzió + NADH; ▒: pollenszem szuszpenzió + NADPH; Bermuda: csillagpázsit (*Cynodon dactylon*); Redtop: fehér tippán (*Agrostis alba*); Timothy: mezei komócsin (*Phleum pratense*); Birch: közönséges nyír (*Betula pendula*); Oak: tölgy (*Quercus* sp.); Plantain: lándzsás útifű (*Plantago major*); Pigweed: szőrös disznóparéj (*Amaranthus retroflexus*); Thistle: homoki ballagófű (*Salsola kali*). (B) Formazán kristályok kiválása a pollenszemeken. Bal oldali kép: hidratált parlagfű pollen (RWP). Középső kép: hidratált RWP + NBT. Jobb oldali kép: hidratált RWP + NBT + NADPH. Nagyítás: 100x. (C) H₂O₂ detektálása RWP szuszpenzióban Amplex Red esszével. Az eredményeket átlag ± SEM formában ábrázoltuk. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

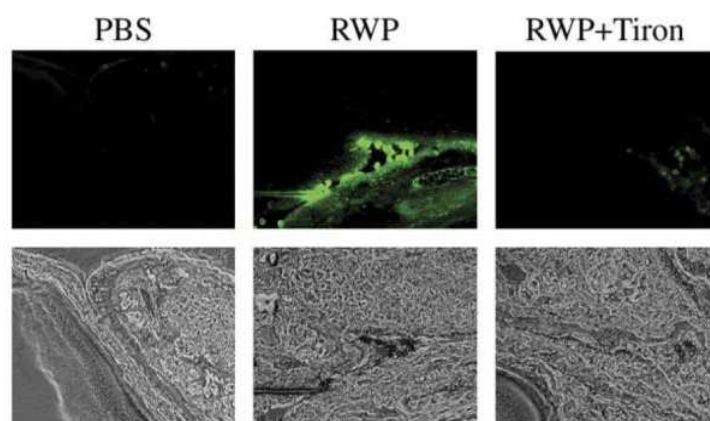
A RWP kezelés dóziszfüggően növelte az intracelluláris DCF jelet a NHBE sejtekben, ami fokozható volt SOD és gátlható Tiron hozzáadásával (14. A ábra). Az intracelluláris DCF jelek változását A549 sejtekben fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A fáziskontraszt és a fluoreszcens képek egymásra illesztésekor kiderült, hogy azokban a sejtekben emelkedett meg jelentősen az intracelluláris ROS szintje, melyek közvetlenül érintkeztek a pollenszemekkel (14. B ábra).



**14. ábra. A parlagfű pollen (RWP) kezelés megnöveli tenyésztett
epitél sejtekben a ROS szintjét**

(A) Dózisfüggő DCF fluoreszcencia növekedés RWP-nel kezelt primer NHBE sejtekben. ■: RWP; □: RWP + SOD; ▒: RWP + Tiron; AU: tetszőleges egység. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. (B) A közvetlen érintkezés a pollenszemekkel megnöveli az intracelluláris ROS szintjét az A549 sejtekben. Bal oldali kép: DCF fluoreszcencia az A549 sejtekben. Középső kép: a RWP-nel kezelt A549 sejtek fáziskontraszt képe. Jobb oldali kép: a fáziskontraszt és a fluoreszcens képek egymásra illesztése. Nagyítás: 200x.

A pollenszemek NAD(P)H oxidázai által generált $O_2^{\bullet-}$ -nak az intracelluláris ROS szintjére gyakorolt hatásának *in vivo* tanulmányozásához naív és szenzitizált egerek kötőhártya epitél sejtjeit H_2DCF -DA-tal töltöttük fel, és RWP-nel vagy PBS oldattal kezeltük. A kezelés után 15 perccel az egereket túlaltattuk, szemeiket eltávolítottuk, fagyasztottuk, majd szövettani metszés után fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A PBS nem, míg a RWP kezelés jelentősen megnövelte a ROS szintjét a kötőhártya epitél sejtjeiben. A RWP előkezelése Tironnal meggátolta az intracelluláris ROS mennyiségének emelkedését (15. ábra). Hasonló jelenség volt megfigyelhető a naív és szenzitizált egereknél is, ami arra utal, hogy a RWP által indukált oxidatív stressz a kötőhártyában független az adaptív immunválaszoktól.



15. ábra. A ROS szintjének változása az egerek kötőhártyájában helyi parlagfű pollen (RWP) kezelés után

Felső képek: DCF fluoreszcencia az egerek kötőhártyájában PBS, RWP és RWP + Tiron kezelés után. Alsó képek: a megfelelő szöveti területek fáziskontraszt képek. A felvételek 4 egérből álló csoportok konjunktiva metszeteit reprezentálják. Nagyítás: 40x.

Annak vizsgálatára, hogy a pollenszemek NAD(P)H oxidázai által indukált oxidatív stressznek van-e szerepe az allergiás kötőhártya-gyulladás azonnali reakcióinak kialakulásában RWE-szenzitizált egereket kezeltünk PBS oldattal, RWP-nel, RWP^H-nel, valamint Tironnal előkezelt RWP-nel. Az egerek allergiás tüneteit (kötőhártya-duzzanat, kötőhártya-vörösség, szemhéj ödéma, viszketés és könnyezés) 20 perccel a kezelések után vizsgáltuk, és egy klinikai pontrendszer szerint 0-4 pont között értékeltük, korábbi vizsgálatoknak megfelelően [213] (II. Táblázat).

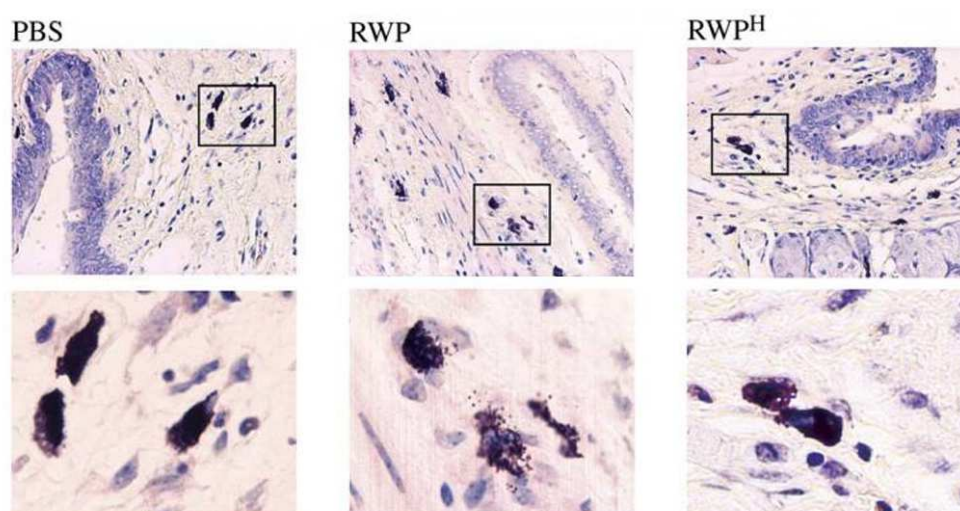
II. Táblázat. Klinikai pontszámok és hízósejt degranuláció

	A feltüntetett módon kezelt, szenzitizált BALB/c egerek csoportjai					
	PBS (n = 6)	RWP (n = 6)	RWP ^H (n = 6)	RWP ^H + (X+XO) (n = 6)	RWP + Tiron (n = 5)	X+XO (n = 6)
Kötőhártya-duzzanat (átlag ± SEM)	0	1.7 ± 0.4**	0.4 ± 0.2	1 ± 0.4**	0.4 ± 0.2	0
Kötőhártya-vörösség (átlag ± SEM)	0	2.3 ± 0.2***	0.5 ± 0.3	1 ± 0.3**	0.6 ± 0.2*	0
Szemhéj ödéma (átlag ± SEM)	0	2.2 ± 0.2***	0.3 ± 0.2	2 ± 0.3***	0.8 ± 0.3*	0
Könnyezés és viszketés (átlag ± SEM)	0	2.5 ± 0.2***	1 ± 0.3**	2.3 ± 0.2***	0.6 ± 0.2*	0.5 ± 0.2
Össz-pontszám (átlag ± SEM; a lehetséges maximális össz-pontszám = 12)	0	8.7 ± 0.6****	2.2 ± 0.75**	6.3 ± 0.5****	2.4 ± 0.5**	0.5 ± 0.2
Hízósejtek a kötőhártyában (sejt/metszet, átlag ± SEM)	5.8 ± 0.1	5.7 ± 0.13	5.9 ± 0.27	6.1 ± 0.07	6.0 ± 0.1	5.8 ± 0.2
Hízósejt degranuláció a kötőhártyában (sejt/metszet, átlag ± SEM)	0	5.1 ± 0.4****	1.5 ± 0.17**	4.9 ± 0.13****	2.1 ± 0.07**	0

* $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$; **** $P < .0001$ vs PBS kontroll.

A RWP kezelt egerek átlag klinikai pontszáma $8,7 \pm 0,6$ (átlag $\pm$ SEM) volt. A klinikai tünetek lényegesen enyhébbek voltak RWP^H kezelés ($2,2 \pm 0,75$), vagy Tironnal előkezelt pollennel történő expozíció esetében ($2,4 \pm 0,5$; **II. Táblázat**). Az eredmények megerősítéséhez az egereket RWP^H-nel és X+XO-zal együttesen kezeltük. A X+XO által előidézett oxidatív stressz súlyosbította a RWP^H-nel kezelt egerek klinikai tüneteit $2,2 \pm 0,75$ -ről $6,3 \pm 0,5$ -re, míg a X+XO önmagában nem idézett elő azonnali allergiás tüneteket a szemben (**II. Táblázat**). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a RWP NAD(P) oxidázai által okozott oxidatív stressz felerősíti az antigén-indukálta korai túlérzékenységi tüneteket az allergiás kötőhártya-gyulladás egér modelljében.

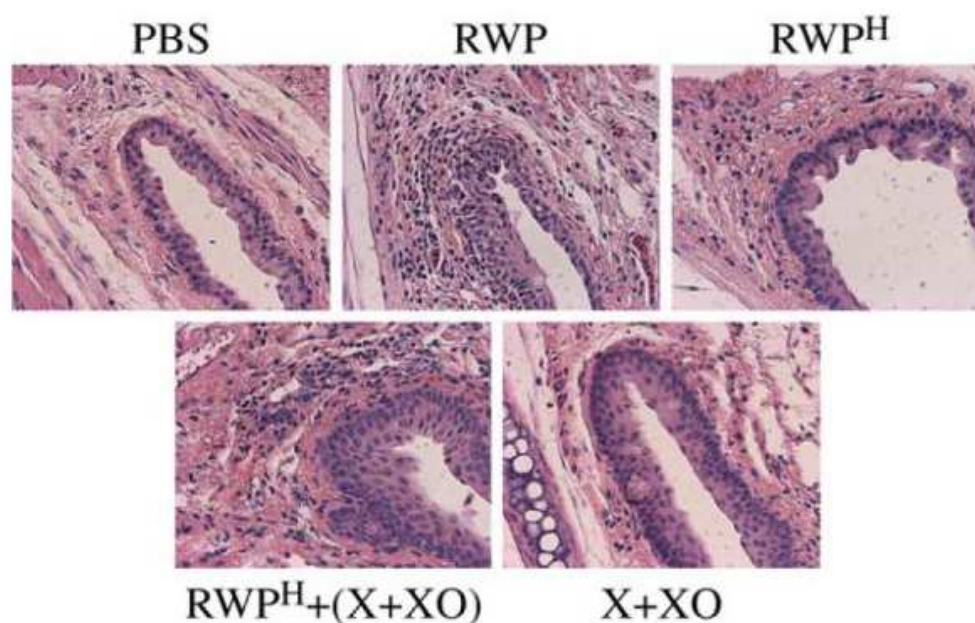
Megvizsgáltuk azt is, hogy a RWP által generált oxidatív stressz befolyásolja-e a hízósejtek degranulációjára és a gyulladásos sejtek infiltrációját a kötőhártyába. A korai (degranuláció), valamint késői (eozinofil infiltráció) fázisoknak megfelelő időpontokat egy előzetes vizsgálat eredményei alapján jelöltük ki [213]. A degranulált hízósejtek számát a kötőhártya-szövetben 3 órával a RWP kezelés után határoztuk meg. A hízósejt degranuláció a RWP^H, valamint a Tironnal előkezelt RWP kezelést követően szignifikánsan alacsonyabb volt az RWP expozícióhoz képest (**16. ábra; II. Táblázat**).



16. ábra. A parlagfű pollen (RWP)-indukálta oxidatív stressz hatása a hízósejtek degranulációjára

Az egerek kötőhártyáját PBS oldattal, RWP-nel vagy hőinaktivált RWP-nel (RWP^H) kezeltük. Az egereket 3 órával a kezeléseik után túlaltattuk, a szemüket eltávolítottuk, és szövettani metszeteket készítettünk. A Giemsa-val festett szöveti mintákat mikroszkóppal vizsgáltuk. A képek 5-6 egérből álló csoportok kötőhártyájának metszeteit reprezentálják. Nagyítás: 100x.

A X+XO együttadása a RWP^H-nel viszont megnövelte a degranulált hízósejtek számát. Habár a hízósejtek száma a kötőhártyában hasonló volt minden kezelt csoportban, a hízósejtek degranulációja lényegesen magasabb volt az oxidatív stresszt indukáló kezelések után (RWP, RWP^H+X+XO; II. Táblázat). A gyulladásos sejtek beáramlását a kötőhártyába 48 órával a RWP kezelés után vizsgáltuk. A RWP kezelés a gyulladásos sejtek, elsődlegesen az eozinofilek, erőteljes infiltrációját váltotta ki (17. ábra). Ezzel ellentétben, kisebb volt a gyulladásos sejtek beáramlása mind a RWP^H, mind a Tironnal előkezelt RWP expozíció esetében (17. ábra). A RWP^H-nel és a X+XO-zal történő szimultán kezelés visszaállította a beáramló eozinofilek számát a kötőhártyában a RWP által indukált szintre (17. ábra). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a kötőhártyában a RWP-indukálta ROS hozzájárul a hízósejtek degranulációjához és a gyulladásos sejtek toborzásához. A kötőhártyában kialakuló oxidatív stressz mértéke szoros összefüggést mutat a klinikai tünetek súlyosságával.



17. ábra. A parlagfű pollen (RWP) által indukált oxidatív stressz elősegíti a gyulladásos sejtek bevándorlását a kötőhártyába

Az egerek kötőhártyáját PBS oldattal, RWP-nel, hőinaktivált RWP-nel (RWP^H), RWP^H+X+XO-dal, vagy X+XO-dal kezeltük. Az egereket 48 órával a kezelések után túlaltattuk, a szemüket eltávolítottuk, és szövettani metszeteket készítettünk. A hematoxilinnal és eozinnal festett szöveti mintákat mikroszkóppal vizsgáltuk. A képek 6 egérből álló csoportok kötőhártyájának metszeteit reprezentálják. Nagyítás: 100x.

Ebben a vizsgálatban igazoltuk, hogy az intakt pollenszemek is képesek szabadgyököket termelni, oxidáz enzimek működése révén. Kimutattuk, hogy ezek a pollen oxidázok, amelyek elsődlegesen $O_2^{\bullet-}$ -t generálnak, a NADH-t és a NADPH-t is használhatják elektron donorként, szemben a fagociták hasonló oxidázaival, amelyeknek elsődlegesen a NADPH a szubsztrátja [207]. Fiziológias pH körülmények között a $O_2^{\bullet-}$, negatív töltése miatt, nehezen tud átjutni membránokon [210]. Kimutattuk azonban, hogy a pollen NAD(P)H oxidázok által termelt $O_2^{\bullet-}$ rövid idő alatt H_2O_2 -dá dizmutálódik, amely könnyedén penetrálja a membránokat, így gyorsan megemeli az intracelluláris ROS szintjét tenyésztett hámsejtekben és az egerek kötőhártyájában is.

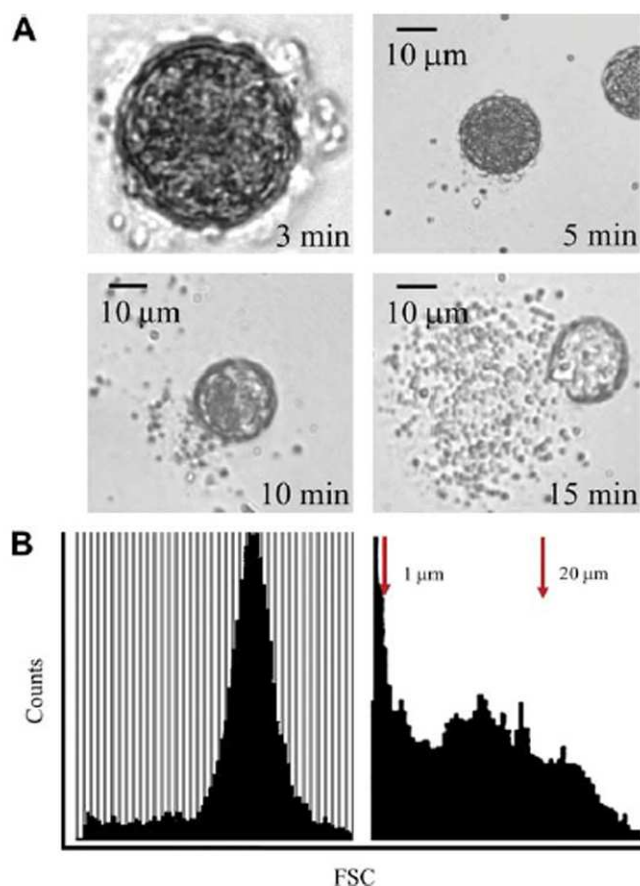
Jól ismert a hízósejtek központi szerepe az allergiás válaszok kialakulásában [214]. Korábbi vizsgálatok szerint $O_2^{\bullet-}$ vagy H_2O_2 expozíció hisztamin felszabadulását indukálja patkány peritoneális hízósejtekben *in vitro* körülmények között [215]. Más tanulmányokban kimutatták, hogy a fokozott oxidatív stressz növeli, míg az antioxidánsok jelentősen csökkentik a hízósejt degranulációt [216, 217]. A szisztémás hipoxia, szintén a hízósejtek degranulációját okozza, oxidatív „burst” indukálásával, amelyet gátolni lehet liponsav antioxidáns hozzáadásával [218]. Összhangban ezekkel a korábbi megfigyelésekkel, eredményeink szerint a pollen NAD(P)H oxidázok által indukált oxidatív stressz is hozzájárulhat a hízósejtek aktiválódásához a kötőhártyában. Ha hőkezeléssel, vagy Tiron kezeléssel elimináltuk a pollenszemek szabadgyök termelését, jelentősen csökkentek a pollenszemek által kiváltott allergiás reakció azonnali tünetei egerekben. Egy későbbi vizsgálatunkban azt találtuk, hogy patkány hízósejtekben (RBL-2H3 sejtvonal) RWE-tal történő kezelés után fokozódik a mitokondriális H_2O_2 termelés [219]. A fokozott mitokondriális ROS kibocsátás hisztamin és szerotonin kiszabadulását eredményezi a sejtekből, függetlenül az IgE ellenanyagok által közvetített szignáloktól. Ez azt jelenti, hogy a pollen NAD(P)H oxidázok által kiváltott oxidatív stressz mitokondriális működési zavarhoz vezethet, és a hízósejtek aktiválódását eredményezheti függetlenül az adaptív immunválasztól. Azonosítottuk, hogy a jelenség hátterében protein kináz C- δ aktiválódása, valamint a szekretoros vezikulák H^+ -ATPáz aktivitásának gátlása áll [219].

Jelen megfigyeléseink szerint a gyulladásos sejtek infiltrációja a kötőhártyába sokkal kisebb mértékű, ha az expozíció során a pollenszemek szabadgyök termelése gátolt. Eredményeink arra utalnak, hogy pollenszemek NAD(P)H oxidázainak specifikus gátlása, vagy a könny antioxidáns kapacitásának fokozása új terápiás lehetőség lehet az allergiás kötőhártya-gyulladás megelőzésében, illetve kezelésében.

5.3. A szubpollen partikulákban jelen vannak az allergén proteinek és a NAD(P)H oxidázok is

Egyes pollen antigének képesek allergiás reakciókat kiváltani a szenzitizált egyének bőrében, szemében, a felső és az alsó légútjaiban is [220]. Nem teljesen világos azonban, hogy ezek a pollen allergének hogyan járulnak hozzá az allergiás gyulladás kialakulásához az alsó légutakban, ugyanis az intakt pollenszemek mérete (20-30 μm) túlságosan nagy ahhoz, hogy könnyen lejussanak oda a belélegzett levegővel. Érdekes és meglepő megfigyelés, hogy jelentős mértékű pollen allergén expozíció következhet be akkor is, amikor a levegőben nem lehet pollenszemeket kimutatni [221]. Gyakran tapasztalható könnyű nyári záporok után, hogy habár a pollenszám drasztikusan lecsökken a levegőben, hirtelen megnő azoknak a betegeknek a száma, akik pollen allergiás panaszokkal keresik fel a kórházak ambulanciáit [222]. Ezekre a jelenségekre magyarázatot adhat, az a korábbi megfigyelés, hogy egyes fa- és fűfélék esetén, ha a pollenszemek hipotóniás közegben (pl. esővíz, harmat) hidratálódnak, akkor allergén tartalmú, mikrométeres, vagy annál is kisebb részecskéket (szubpollen partikula, SPP) bocsátanak ki magukból [223-226]. Azt feltételezik, hogy ezek a SPP-k, amelyek méretüknél fogva (0,12 – 5 μm) könnyen lejutnak az alsóbb légutakba is, számottevő forrásai az allergéneknek és elsődleges okozói a súlyos asthmás rohamoknak pollenszezon idején [220, 227-229].

Ezeket a korábbi megfigyeléseket alapul véve, megvizsgáltuk, hogy a hipotóniás közegbe (frissen gyűjtött esővízben, vagy 0,05 M Na_2CO_3 oldatban) helyezett parlagfű pollenszemek is kibocsátanak-e SPP-kat a hidratáció során. Ahogy a fáziskontraszt mikroszkópos képeinken megfigyelhető (**18. A ábra**), egyes hidratált parlagfű pollenszemekből SPP-k szabadultak ki, egy póruson keresztül. A SPP-k kialakulása a hidratáció kezdete után 3-5 perccel indult, és egyes pollenszemeknél még 60 perc múlva is megfigyelhető volt. A kereskedelmi forgalomból származó pollenszemek kb. 0,1-0,5 %-ánál figyeltünk meg SPP képződés, míg frissen gyűjtött pollenszemek esetén ez az arány ~35 % volt. A mikroszkópos és az áramlási citometriás vizsgálatok alapján a SPP-k mérete 0,5 és 4,5 μm között van (**18. B ábra**). Hasonló eredményeket kaptunk a szőrös disznóparéj pollenjének vizsgálata során. A frissen gyűjtött pollenszemek ~45 %-ából szabadultak ki SPP-k, amelyeknek a mérete szintén a 0,5 - 4,5 μm mérettartományba esett (ezeket az adatokat nem mutatom). Az az új megfigyelésünk, hogy a parlagfű pollenszemek is képesek SPP-k kibocsátására, összhangban van azokat a korábbi adatokat, amelyek szerint légköri levegő analízise során, többszintű szűrőrendszerrel ellátott mintavevő készülékben, a részecskék 0,2 – 5,25 μm közötti mérettartományában parlagfű pollen allergének jelenlétét detektálták [230].

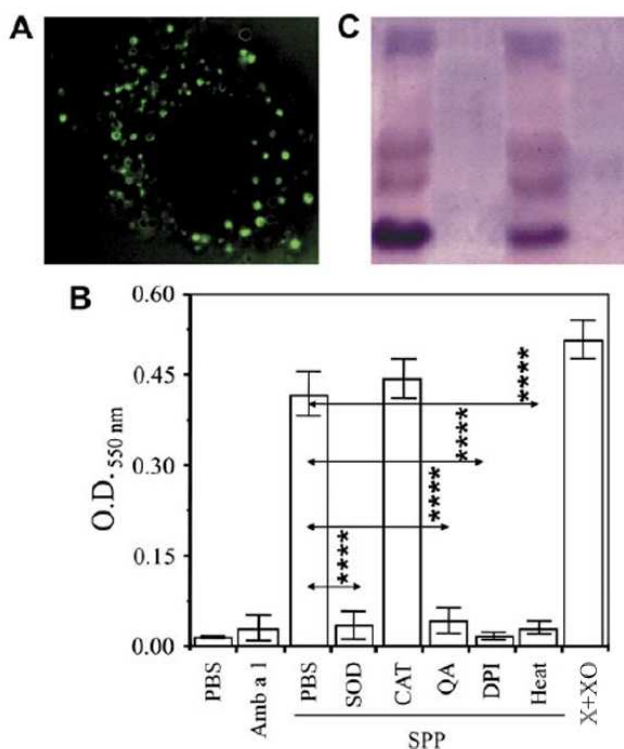


18. ábra. A SPP-k kiszabadulása parlagfű pollenszemekből

(A) A SPP-k kiszabadulásának kinetikája a parlagfű pollenszemekből. Balról jobbra: vezikulum-szerű kitüremkedések a pollen felszínén (Nagyítás: 300x); a 0,5 - 4,5 μm méretű SPP-k kiszabadulása (5, 10 és 15 perccel a hidratáció kezdetétől) (Nagyítás: 100x). (B) A parlagfű pollen szuszpenzió részecskéinek méretbeli eloszlása 5 (bal panel), illetve 30 perccel (jobb panel) a hidratáció után. FSC: Forward scatter paraméter.

A következőkben megvizsgáltuk, hogy az intakt pollenszemekben és a pollen kivonatokban kimutatott NAD(P)H oxidázok jelen vannak-e a SPP-kban is. A parlagfű pollen szuszpenzióból izolált SPP-k H_2DCF -nel való inkubációja fluoreszcens DCF keletkezését eredményezte (**19. A ábra**). Amikor a SPP szuszpenzióhoz NBT-ot adtunk, formazán képződés volt detektálható (**19. B ábra**). A NBT esszé során a SOD jelenléte lecsökkentette a keletkezett formazán mennyiségét, a $\text{O}_2^{\bullet-}$ gyors H_2O_2 -dá alakítása miatt. Kataláz hozzáadása a reakcióelegyhez nem befolyásolta a formazán képződését. Hőkezelés (72°C , 15 perc), vagy DPI és QA hozzáadása jelentősen csökkentette a SPP-k NBT redukáló képességét (**19. B ábra**). Korábbi kísérleteinkhez hasonlóan (**5. A ábra**), a tisztított Amb a 1 allergén nem redukálta az NBT-ot (**19. B ábra**). Ezekben a kísérletekben X+XO szubsztrát-

enzim rendszert alkalmaztunk pozitív kontrollként, ami a NAD(P)H oxidázokhoz hasonlóan elsődlegesen $O_2^{\bullet-}$ -t generál. A továbbiakban nem-denaturáló poliakrilamid gélen választottuk el a SPP-k fehérjéit, és *in situ* NBT esszével teszteltük a $O_2^{\bullet-}$ termelődését. A NADPH hozzáadása után, szabad szemmel is jól látható, NBT-redukáló sávok jelentek meg a gélekben (**19. C ábra**). Eredményeink azt mutatják, hogy a pollenszemekben korábban kimutatott NAD(P)H oxidázok a SPP-kban is jelen vannak.

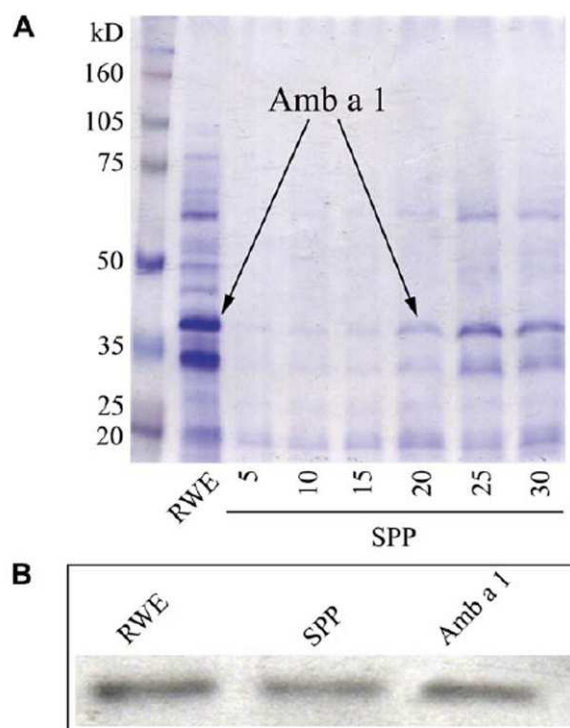


19. ábra. A SPP-k redox aktivitással rendelkeznek

(A) A parlagfű SPP-k a H_2DCF -t fluoreszcens DCF-né alakítják át (Nagyítás: 196x). (B) Hőkezelés (Heat), vagy NAD(P)H oxidáz inhibitorok hozzáadása jelentősen csökkenti a SPP-k NBT redukáló képességét. SOD: szuperoxid dizmutáz; CAT: kataláz; QA: quinankrin; DPI: difenilén-jodónium; GO: glükóz oxidáz. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk ($n = 5-7$). (C) A nem-denaturáló PAGE-sel elválasztott SPP fehérjék *in situ* NBT redukciója. 1. sáv: parlagfű SPP; 2. sáv: hőkezelt parlagfű SPP; 3. sáv: parlagfű pollen kivonat; 4. sáv: hőkezelt parlagfű pollen kivonat. **** $P < 0,0001$ vs kontroll.

A parlagfű pollenből származó SPP-k fehérje összetételének meghatározásához denaturáló PAGE végeztünk. Coomassie brilliant blue G250 festés alapján a SPP-kban található fehérjék elektroforetikus mintázata hasonló a kereskedelemben kapható RWE-éhoz (**20. A ábra**). Egy ~38 kD-os fehérjének megfelelő sáv jelen volt a RWE-ban és a SPP-kban

is, ez valószínűleg az Amb a 1 proteinnek, a parlagfű pollen egyik fő allergénjének felel meg. Western blot analízissel sikerült igazolnunk az Amb a 1 jelenlétét a parlagfű SPP-kban (**20. B ábra**). Protein szekvencia analízis szerint, a RWE-ban és a SPP-kban is jelenlévő ~38 kD-os fehérjének az N-terminális végén elhelyezkedő 15 aminosav 100%-os szekvencia homológiát mutatott az Amb a 1 proteinnel.

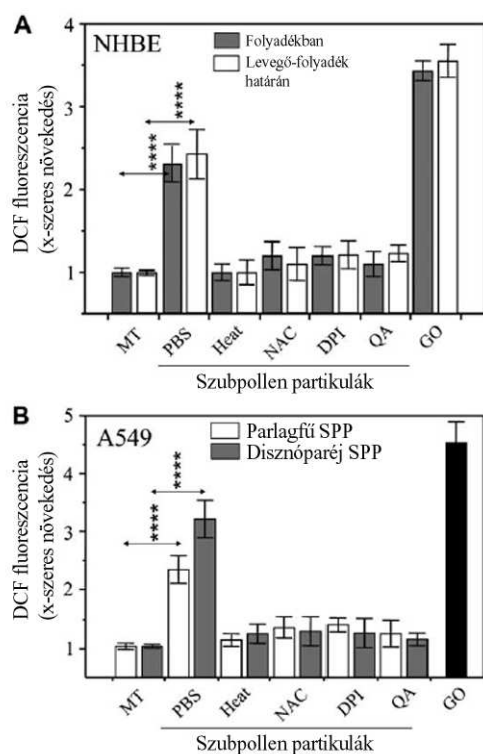


20. ábra. A parlagfű pollenből származó SPP-k tartalmazzák az Amb a 1 allergént

(A) Parlagfű pollen kivonat (RWE) és a szubpollen partikula (SPP) lizátumok SDS-PAGE vizsgálata. Az elválasztott fehérjéket Coomassie brilliant blue G250 festékkel tettük láthatóvá. (B) Az Amb a 1 allergén kimutatása a SPP-kban western blottal.

A következő kísérletben azt kívántuk meghatározni, hogy vajon a SPP expozíció megemeli-e a ROS szintjét tenyésztett epitél sejtekben (NHBE és A549). A NHBE sejteket vagy folyadékban, vagy levegő-folyadék fázishatáron növesztettük. Miután a sejteket feltöltöttük H₂DCF-DA-tal, SPP-kat adtunk hozzájuk (20 µg/ml). A SPP kezelés után gyors DCF fluoereszcencia növekedést lehetett detektálni, mind a folyadékban növesztett, mind a levegő-folyadék fázishatáron tenyésztett sejtekben (**21. A ábra**). Hasonló eredményeket kaptunk A549 sejtek esetében is (**21. B ábra**). A ROS szintjének emelkedése megakadályozható volt a SPP-k előzetes hőkezelésével, vagy a sejtek antioxidáns kapacitásának NAC hozzáadásával történő megnövelésével (**21. ábra**). A SPP szuszpenzió

előkezelése DPI, vagy QA NAD(P)H oxidáz inhibitorokkal, szignifikánsan csökkentette az intracelluláris ROS szintjét mind NHBE, mind A549 sejtekben (**21. ábra**). A disznóparéj pollenből származó SPP-k által indukált intracelluláris ROS mennyisége hasonló volt a parlagfű SPP-k által indukálthoz. Ezekben a kísérletekben pozitív kontrollként glükóz oxidázt (GO) használtunk.

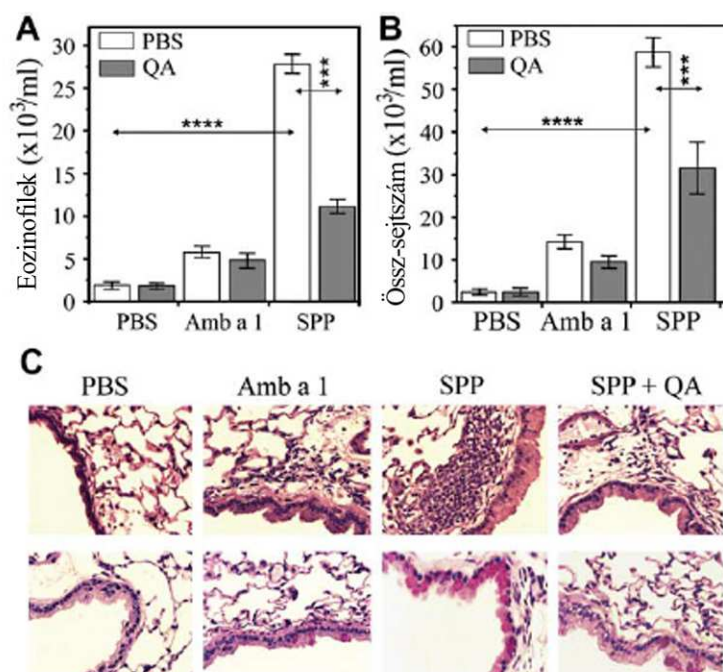


**21. ábra. A SPP expozíció megnöveli az intracelluláris ROS szintjét
légúti epitelsejtekben**

(A) DCF fluoreszcencia szintek a folyadékban növesztett, vagy levegő-folyadék határfelületen tenyésztett NHBE sejtekben parlagfű SPP kezelés után. (B) Parlagfű pollenből, vagy disznóparéj pollenből kiszabaduló SPP-kkal kezelt A549 sejtek. Pozitív kontrollként glükóz oxidázt használtunk (GO). MT: (mock-treated) ál-kezelt; Heat: hőkezelt (72 °C, 15 perc); NAC: N-acetil-L-cisztein; QA: quinankrin; DPI: difenilén-jodónium. Minden eredmény 4-6 mérésnek az átlaga $\pm$ SEM formában ábrázoltunk. **** $P < 0,0001$ vs kontroll.

A SPP-k allergiás gyulladást kiváltó képességének vizsgálatához a már korábban bemutatott egér modellt használtuk. A szenzitizált egereket intranazálisan kezeltük PBS oldattal, Amb a 1 allergénnel (25 μ g) vagy SPP szuszpenzióval (25 μ g). SDS-PAGE és denzitometriás analízissel megállapítottuk, hogy a 25 μ g SPP kb. 2,1 μ g Amb a 1 proteint tartalmaz. A SPP kezelés az Amb a 1 kezeléshez képest - a BAL folyadékban található

eozinofilek, és az összes gyulladásos sejt száma alapján - a szenzitizált egerekben súlyosabb gyulladás kialakulásához vezetett (**22. A és B ábra**). A SPP-kkal kezelt állatok tüdőmetszeteinek peribronchiális területein erőteljesebb volt az eozinofilek akkumulációja, és nagyobb a mucin-termelő sejtek száma, mint az Amb a 1 allergénnel kezelt egerek esetében (**22. C ábra**). A NAD(P)H oxidáz inhibitor QA együttes adása az SPP-kkal erősen csökkentette az eozinofilek és más gyulladásos sejtek beáramlását a légutakba (**22. A és B ábra**), valamint csökkentette a kehelysejtek metapláziáját a légúti epitéliumban (**22. C ábra**). A nem-szenzitizált állatok légútjaiban sem a SPP, sem az Amb a 1 nem okozott gyulladást (ezeket az adatokat nem mutatom). Ezek az eredmények azt tükrözik, hogy a SPP-k, antigén tartalmuk, valamint a NAD(P)H oxidáz aktivitásuk révén, az alsó légutak gyulladásos folyamatainak potens kiváltói lehetnek emberben is.



22. ábra. A szubpollen partikulák (SPP-k) súlyos légúti gyulladás kiváltására képesek egerekben

(A és B) A SPP-k súlyos légúti gyulladást váltanak ki. A szenzitizált egereket intranazálisan kezeltük PBS oldattal, Amb a 1 allergénnel, vagy SPP szuszpenzióval, quinankrin (QA) jelenlétében vagy hiányában. A BAL folyadékban levő eozinofilek (A) és összes gyulladásos sejtek (B) számát 3 független kísérlet átlaga $\pm$ SEM formában ábrázoltuk ($n = 3-5$ egér/csoport). (C) A gyulladásos sejtek infiltrációja a peribronchiális térbe (felső sor) és a kehelysejtek metaplázia (alsó sor). Az egereket 72 órával a kezelések után túlaltattuk, a tüdejüket kivettük, fixáltuk, és szövettani metszeteket készítettünk. A metszeteket hematoxin-eozin és PAS festéssel festettük meg ($n = 7-9$). *** $P < 0,001$ vs kontroll.

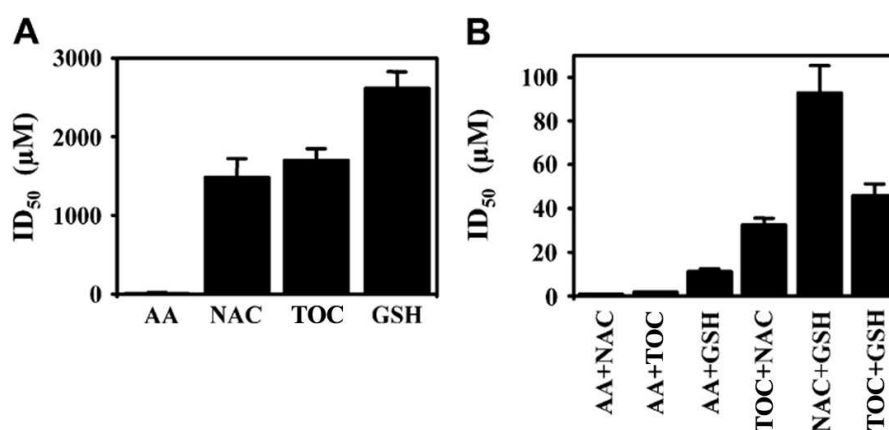
Elsőként sikerült kimutatnunk, hogy a parlagfű pollenszemek is képesek SPP-k kibocsátására. Kísérleteinkben a parlagfű pollenszemeket hipotóniás közegben hidratáltuk, hogy kiváltsuk az SPP-k képződését. Kiderült azonban, hogy nemcsak a nedvesség segíti elő a pollenszemek felnyílását, hanem viharos időben erős elektromos mezők alakulnak ki és a talajról felszabaduló pozitív ionok is felrepeszthetik a pollenfalat [231]. Sőt, szeles időben a pollenszemek szilárd felszínekhez való ütdése is kiválthatja az SPP-k kibocsátását [232].

Méréseink szerint a parlagfű SPP-k mérete a 0,5 - 4,5 μm mérettartományba esik, így a belégzett SPP-k méretüknél fogva képesek az alsóbb légutakba is jutni. A tüdőben a hámfelszínt vékony folyadékfilm borítja, és a belélegzett SPP-k először ezzel a felülettel kerülnek kapcsolatba. A vizes fázisban az SPP-k a hámsejtek felszínén található, a kollektinek családjába tartozó felületaktív anyaghoz, a surfactant protein D-hez (SP-D) kötődnek. Az SPP-eket a hámsejtek SP-D-mediált mechanizmussal képesek felvenni, ami gyulladásos citokinek és kemokinek képződését eredményezi [233, 234].

Eredményeink szerint a parlagfű SPP-k súlyos allergiás légúti gyulladást képesek indukálni, ugyanis jelen van bennük az Amb a 1 allergén és a NAD(P)H oxidáz aktivitás is. A szubpollen részecskék szabadgyök termelő képességét más növényfajokban (japán szugifenyő *Cryptomeria japonica* és kagylóciprus *Chamaecyparis obtusa*) is kimutatták [197]. A pollen NAD(P)H oxidázok által termelt $\text{O}_2^{\bullet-}$ még agresszívabb oxigén származékká alakulhat át, amely felerősítheti a gyulladásos folyamatokat [235]. Ezzel összhangban, a parlagfű SPP kezeléshez használt szuszpenzió, amely csak 2,1 mg Amb a 1-gyet tartalmazott, sokkal súlyosabb gyulladást indukált a szenzitizált egerekben, mint a kontrollként használt allergén oldat, amiben 25 mg Amb a 1 protein volt. A reaktív gyökök közvetlenül, vagy lipidperoxidációs termékek indukálásával, mint például a 4-HNE, az akrolein, vagy az F(2)-izoprosztánok, különféle stressz-kinázokat (pl. extracelluláris szignál-regulált kináz, c-Jun NH(2)-terminális kináz, MAPK és p38), valamint redox-szenzitív transzkripciós faktorokat (pl. NF- κ B és AP-1) aktiválnak. A folyamatok eredményeként fokozódik a gyulladásos citokinek termelése [236, 237]. Adataink azt is sugallják, hogy az SPP-asszociált oxidázok inhibitorai vagy antioxidáns anyagok használata hasznos lehet a légúti oxidatív stressz és a gyulladások megelőzésében vagy mérséklésében pollenszezon idején.

5.4. A pollen NAD(P)H oxidázok által termelt szabadgyökök hatástalanítása lokálisan alkalmazott antioxidánsokkal gátolja az allergiás légúti gyulladás kialakulását

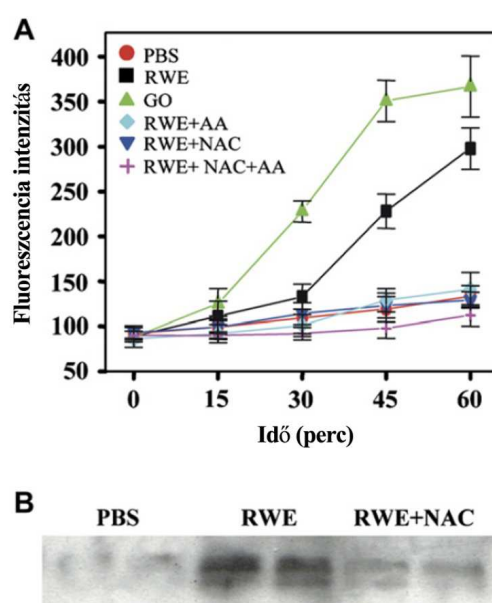
Az eddigi eredményeink szerint, pollen expozíciót követően a súlyos allergiás légúti gyulladás kialakulásához az allergének mellett a pollen NAD(P)H oxidázok által indukált oxidatív stressz is hozzájárul. Ebben a tanulmányban azt vizsgáltuk, hogy lokálisan alkalmazott antioxidánsok képesek-e hatástalanítani a pollen NAD(P)H oxidázok által termelt szabadgyököket, és ha igen, akkor ez hogyan befolyásolja a kialakuló allergiás légúti gyulladást. Először különböző antioxidánsok (AA, NAC, és tokoferol) hatékonyságát hasonlítottuk össze ID_{50} értékük alapján a RWE által generált ROS közömbösítésében sejtmentes körülmények között. A vizsgálathoz a már korábban is alkalmazott, redox-szenzitív $H_2DCF-DA$ próbát használtuk. Az AA nagyon hatékonyan eliminálta a szabadgyököket (ID_{50} : 5 μM), amíg a NAC és a tokoferol ID_{50} értékei sokkal magasabbak voltak (1500, illetve 1900 μM ; **23. A ábra**). Ezek az adatok összhangban vannak azzal, hogy a NAC egy glutation prekursor és önmagában alacsony az antioxidáns potenciálja. A glutation a glutation peroxidáz elektron akceptoraként szolgál és negatív kontrollként alkalmaztuk (ID_{50} : 2700 μM). Az antioxidánsok kombinált alkalmazása során az AA+NAC ID_{50} értéke 1 μM , az AA+tokoferol ID_{50} értéke pedig 2 μM volt (**23. B ábra**). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az AA kombinációja NAC-nel vagy tokoferollal szinergisztikus módon ($P=0,003$ és $P=0,001$) hatástalanítja a RWE által termelt ROS-t.



23. ábra. Sejtmentes körülmények között az antioxidánsok hatástalanítják a RWE által termelt reaktív szabadgyököket

Az antioxidánsok egyedi (A) és kombinált (B) ID_{50} értékei. AA: aszkorbinsav; NAC: N-acetil-cisztein; TOC: tokoferol; GSH: glutation.

A következőkben az antioxidánsok hatását *in vitro* tenyésztett légúti hámsejteken vizsgáltuk. A RWE kezelés hatására a H₂DCF-DA festékkel feltöltött A549 sejtekben szignifikánsan megnőtt a DCF fluoreszcencia, míg AA és NAC jelenlétében a DCF szignál az alapszint közelében maradtak (24. A ábra). Korábban kimutattuk, hogy az intranazális RWE kezelés megnöveli a 4-HNE szintjét a BAL folyadékban (7. B ábra). A RWE kezelés hatására kialakuló 4-HNE-protein komplexek az egerek tüdejének lizátumából is kimutathatók Western blot módszer segítségével. Ha az intranazális RWE kezelést AA+NAC egyidejű hozzáadásával végeztük el, a tüdőkben sokkal kevesebb 4-HNE-protein komplex volt detektálható (24. B ábra).

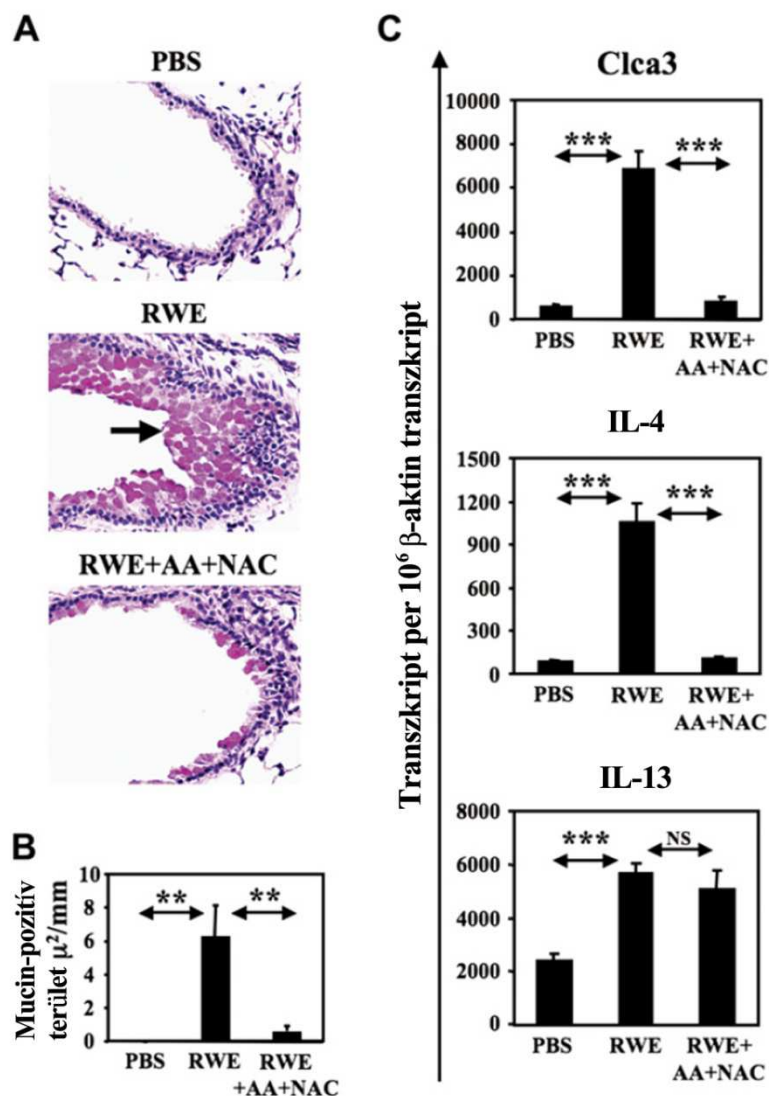


24. ábra. Antioxidánsok hatása a RWE által indukált intracelluláris ROS szintjére tenyésztett hámsejteken és a 4-HNE-fehérje komplex képződésre *in vivo*

(A) Antioxidánsok hatása a RWE által indukált intracelluláris ROS szintjére A549 sejtekben. A vizsgálathoz a sejteket H₂DCF-DA festékkel töltöttünk meg, majd a kezeléseket követően az intracelluláris DCF fluoreszcenciát fluoriméterrel detektáltuk. (B) A NAC hatása a RWE által indukált 4-HNE-protein komplexek kialakulására a tüdőben. Mindegyik sáv külön egeret reprezentál. RWE: parlagfű pollen kivonat; GO: glükóz oxidáz; AA: aszkorbinsav; NAC: N-acetil-cisztein; 4-HNE: 4-hidroxinonenal.

Az allergiás asztma egyik jellegzetessége a megnövekedett mucin termelődés [238]. Az intranazális PBS kezelés nem indukált mucin termelést (25. A ábra), mivel a mucinra pozitívan festődő terület nagysága mindössze 0,0002 μm^2 volt 1 mm hörgő-hosszra számítva (25. B ábra). A RWE kezelés 33 000-szeresére növelte a mucinra festődő terület nagyságát

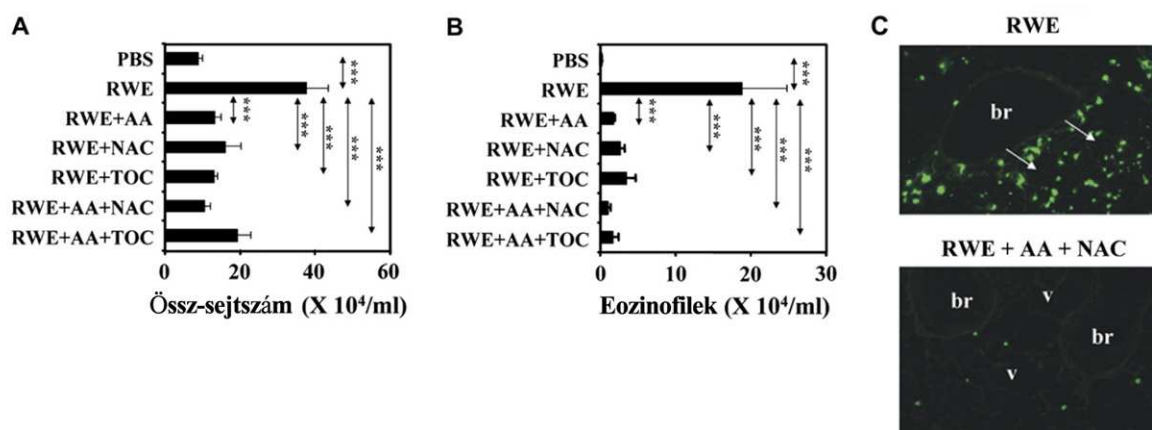
a légutakban ($P < 0,01$) (25. A és B ábra). Intranazális RWE és egyidejű AA+NAC kezelés esetén a mucinra festődő terület csupán 10-szeresére nőtt a PBS kezeléshez viszonyítva ($P < 0,01$) (25. A és B ábra).



25. ábra. Az AA+NAC hatása a RWE kezelés által indukált mucin termelésre

(A) A RWE-szenzitizált BALB/c egereket 72 órával az intranazális PBS, RWE, vagy RWE+AA+NAC kezelés után túlaltattuk, a tüdejüket kivettük, fixáltuk, és szövettani metszeteket készítettünk. A PAS-festéssel megfestett tüdő metszeteken a nyilak a PAS-pozitív mucin cseppeket mutatják. Nagyítás: 200x. (B) A mucin-tartalmú sejtek kvantitatív meghatározásuk morfológikus elemzéssel. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM formájában ábrázoltuk ($n = 3-6$ egér/csoport). (C) A *Clca3*, az *IL-4* és az *IL-13* gének tüdőbeli kifejeződésének detektálása valós idejű kvantitatív PCR-rel. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,005$. RWE: parlagfű pollen kivonat; AA: aszkorbinsav; NAC: N-acetil-cisztein.

A *Clca3* gén, amely a mucin termelést szabályozza, szelektíven fejeződik ki a szenzitizált egerek légúti kehelysejtjeiben allergénnel történő kezelést követően [239]. Az intranazális RWE kezelés 10-szeres növekedést okozott a *Clca3* átíródásában a PBS-hez viszonyítva, 72 órával a kezelés után (**25. C ábra**). Az AA+NAC együttes adása a RWE-tal 7-szer alacsonyabb szintű *Cac/3* átíródást eredményezett (**25. C ábra**). Az IL-4 mind *in vitro*, mind *in vivo* képes mucin gén kifejeződést és kehelysejt metapláziát indukálni [240], ezért megmértük az IL-4 expressziós szintjét a tüdőben 4 órával a RWE kezelés után. Az intranazális RWE kezelés 12-szeres növekedést okozott az IL-4 kifejeződésében a PBS kezeléshez viszonyítva. Az AA+NAC jelenléte a RWE mellett a kezelés során, tizedére csökkentette az IL-4 expressziójában bekövetkező növekedést a tüdőben a RWE kezeléshez képest (**25. C ábra**). Az IL-13 szintén nagyon fontos szerepet játszik a mucin termelés szabályozásában [241], ezért megvizsgáltuk az antioxidánsok hatását a RWE-indukált IL-13 kifejeződésre is a tüdőben. Az intranazális RWE kezelés 2-szeres növekedést indukált az IL-13 expressziójában a PBS kezeléshez viszonyítva, 4 órával a kezelés után. Modellünkben az AA+NAC jelenléte a RWE mellett, nem eredményezett alacsonyabb IL-13 mRNS szintet a tüdőszövetben (**25. C ábra**). Ezek az adatok azt sugallják, hogy az antioxidánsok együtt adása a RWE-tal, és ezáltal a pollen eredetű ROS közömbösítése a tüdőben, csökkenti a mucin termelést, valamint az IL-4 és a *Clca3* gének kifejeződését.

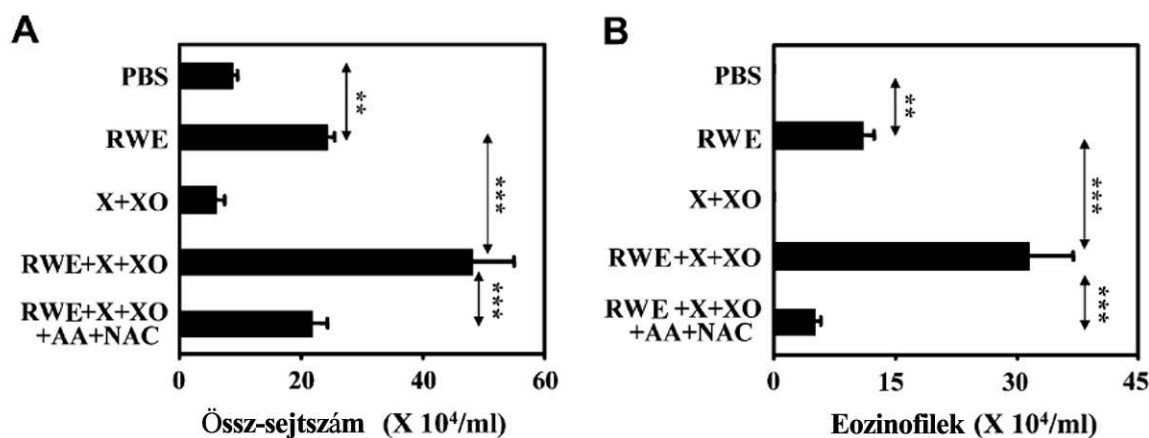


26. ábra. A pollen NAD(P)H oxidázok által generált ROS közömbösítése gátolja az allergiás gyulladást a tüdőben

Az összes gyulladásos sejt (A) és az eozinofilek (B) a RWE-tal kezelt egerek BAL folyadékában. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM formájában ábrázoltuk ($n = 7-9$ egér/csoport). *** $P < 0,001$. (C) Antioxidánsok hatása az eozinofilek beáramlására a peribronchiális (br) és a perivascularis (v) régiókban (nyílak). Nagyítás: 100x. RWE: parlagfű pollen kivonat; AA: aszkorbinsav; NAC: N-acetil-cisztein; TOC: tokoferol.

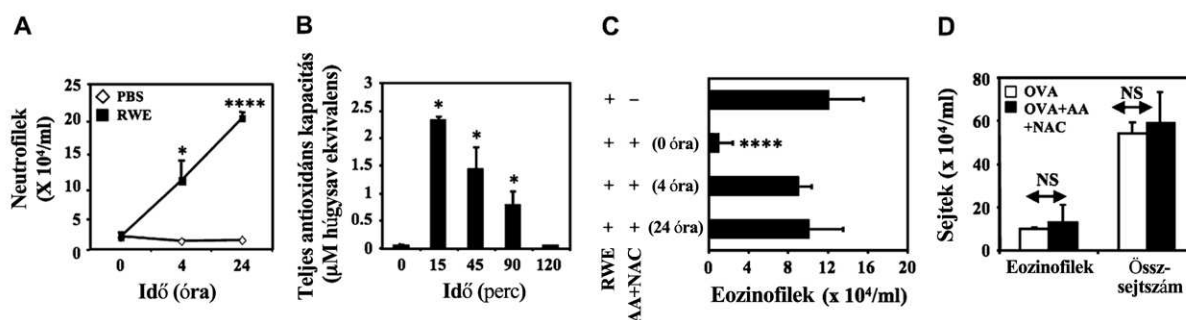
A következő kísérletben az antioxidánsok hatását akartuk tanulmányozni a RWE-indukált allergiás gyulladásra, ezért RWE-szenzitizált egereknek az intranazális RWE kezeléssel kombinálva különböző antioxidánsokat adtunk. A PBS kezelés minimális gyulladásos sejt beáramlást váltott ki a tüdőben, ezzel szemben a RWE kezelés az össz-sejtszámot 4-szeresére, az eozinofilekét pedig 100-szorosára növelte a BALF mintákban (**26. A és B ábra**). A pollen NAD(P)H oxidázok által indukált ROS közömbösítése a RWE-tal együtt beadott AA, tokoferol, NAC, vagy ezek kombinációi által, 2-3-szoros csökkenést eredményezett a beáramló a gyulladásos sejtek számában, és 5-10-szeres csökkenést az eozinofilekében (**26. A és B ábra**). Az AA+NAC kombinációja szintén lecsökkentette a akkumulálódó eozinofilek számát a peribronchiális területeken (**26. C ábra**).

Korábbi megfigyeléseinkkel összhangban (**8. ábra**), amikor RWE-szenzitizált egereket X+XO-zal kezeltünk intranazálisan, az nem vezetett gyulladásához. Ahogyan az várható volt, a RWE-tal együtt adva a X+XO megnövelte az összes gyulladásos sejt, és az eozinofilek akkumulációját is a légutakban (**27. A és B ábra**). Amikor viszont az oxidatív stresszt elimináltuk az AA+NAC együttes adásával, az drasztikusan csökkentette a kiváltott légúti gyulladást (**27. A és B ábra**). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a pollen NAD(P)H oxidázok által kiváltott oxidatív stressz antioxidánsokkal való gátlása szignifikánsan csökkenti az allergiás légúti gyulladást.



27. ábra. Az antioxidánsok hatása a X+XO által felerősített allergiás légúti gyulladásra
 Antioxidánsok hatása a X+XO által elősegített összes gyulladásos sejt (A) és eozinofil (B) beáramlásra a légutakba. Az eredményeket a BAL folyadékban meghatározott sejtszámok átlaga $\pm$ SEM formában mutatjuk be ($n = 7-9$ egér/csoport). ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. RWE: parlagfű pollen kivonat; X+XO: xantin+xantin oxidáz; AA: aszkorbinsav; NAC: N-acetil-cisztein.

Az allergén expozíció egy kezdeti neutrofil beáramlást indukál, amit eozinofil akkumuláció követ a légutakban [242], és ezek a sejtek, illetve az általuk termelt szabadgyökök hozzájárulnak a légúti oxidatív stresszhez az allergiás gyulladás során [52]. A következő lépés annak tisztázása volt, hogy vajon az antioxidánsok hatása a RWE által indukált légúti gyulladásra, a beáramló neutrofil, illetve eozinofil granulocitákból származó ROS semlegesítésén keresztül történik-e. A neutrofilek akkumulálódása a szenitizált egerek RWE kezelése után 4 órával kezdődött és a 24 óránál érte el a csúcspontját (**28. A ábra**).



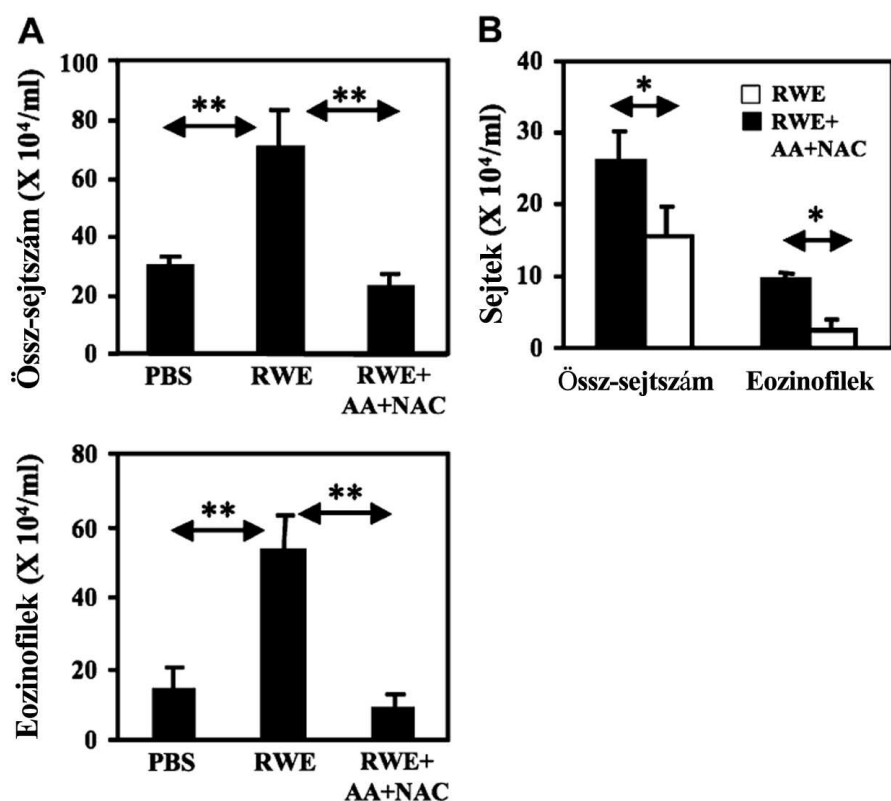
28. ábra. A pollen NAD(P)H oxidázok által termelt ROS eliminálása hatásosabb az allergiás gyulladás csökkentésében, mint a gyulladásos sejtek által generált ROS közömbösítése

(A) Neutrofil granulociták akkumulációjának kinetikája a légutakban. RWE-szenitizált egereket PBS vagy RWE oldattal kezeltünk, majd a feltüntetett időpontoknak megfelelően túlaltattunk, azután megvizsgáltuk a BAL folyadék sejttözetét. (B) Az AA+NAC egyszeri, intranazális beadása 90 percig megnövelte a légutak teljes antioxidáns kapacitását. Az x-tengely az időt jelképezi az antioxidánsok beadását követően. Az eredményeket átlag ± SEM formában mutatjuk be (n = 3-6 egér/csoport). (C) Az eozinofilek akkumulációjának vizsgálata a légutakban az antioxidánsok beadása után eltelt idő függvényében. Az eredményeket átlag ± SEM formában mutatjuk be (n = 7-9 egér/csoport). *P < 0,05; ****P < 0,0001. (D) BALB/c egereket szenitizáltunk OVA-nal, majd porlasztott OVA-nal kezeltünk. Az egerek intranazális PBS vagy AA+NAC kezelést is kaptak közvetlenül az OVA expozíció előtt és után. NS: nem szignifikáns; RWE: parlagfű pollen kivonat; AA: aszkorbinsav; NAC: N-acetil-cisztein, OVA: ovalbumin.

Az intranazálisan beadott egyszeri dózisú AA csak 90 percig növelte meg a légutak teljes antioxidáns kapacitását, így az 2 óra múlva már ismét az alapszinten volt (**28. B ábra**). Az AA+NAC kezelésnek ezt a légutak antioxidáns kapacitására kifejtett, rövid ideig tartó hatását használtuk fel, hogy összehasonlítsuk a pollen NAD(P)H oxidázokból, valamint a beáramló neutrofilekből származó ROS eliminálásának következményeit. A RWE által

termelt ROS semlegesítése az együtt adott antioxidánsokkal, megakadályozta az eozinofilek jelentős infiltrációját a légutakba **(28. C ábra)**. Ezzel szemben, a 4-24 óránál toborzott neutrofilek által termelt ROS közömbösítése nem akadályozta meg az allergiás gyulladás kialakulását **(28. A és C ábra)**. Az AA+NAC beadása szintén nem gátolta meg az ovalbumin (OVA, oxidatív stresszt közvetlenül nem okozó allergén) által kiváltott allergiás légúti gyulladást **(28. D ábra)**. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az antioxidánsok a pollen NAD(P)H oxidáz által generált oxidatív stressz eliminálásával képesek csökkenteni a légúti allergiás gyulladást, azonban a légutakba bevándorló gyulladásos sejtekből származó ROS semlegesítésében már nem hatékonyak.

A légúti allergia modellünkben, ahol egyszeri intranazális RWE kezeléssel váltjuk ki a gyulladást a tüdőben, a gyulladásos sejtek infiltrációja az intranazális kezelés utáni 3. napon éri el maximumát (csúcs fázis) és a 10. napra fejeződik be (lecsengő fázis). Mivel az antioxidánsok blokkolták a RWE-indukált allergiás gyulladást az egyszeri-kezeléses modellünkben, ezért megvizsgáltuk a hatásukat egy második, a csúcs, vagy a lecsengő fázis alatti RWE kezelésre is. A csúcs fázis alatti RWE kezelés egy robusztus gyulladásos sejt beáramláshoz vezetett a tüdőben, az össz-sejtszám 2,4-szeresére és az eozinofil granulociták száma 3,6-szeresére emelkedett **(29. A ábra)**. Az AA+NAC együtt adása a RWE-tal a csúcs fázis alatt lecsökkentette az össz-sejtszámot a harmadára, az eozinofil számot pedig a hatodára **(29. A ábra)**. Ehhez hasonlóan az AA+NAC együtt adása a RWE-tal a lecsengő fázisban 1,7-szer kisebb össz-sejtszámot, és 3,7-szer kevesebb eozinofil számot eredményezett a csak RWE-tal végzett újra stimuláláshoz képest **(29. B ábra)**. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a pollen NAD(P)H oxidázok által indukált oxidatív stressz ismételt pollen expozíció során további gyulladáskeltő szerepet tölt be.



29. ábra. Az antioxidánsok meggátolják a második pollen expozíció által kiváltott súlyosbodását az allergiás légúti gyulladásnak

(A) Az AA+NAC megakadályozza a második RWE kezelés (3 nappal az első után) által kiváltott súlyosbodását a légúti gyulladásnak. A RWE-szenzitizált egereket RWE-tal kezeltük intranazálisan, majd 72 óra múlva PBS, RWE vagy RWE+AA+NAC oldattal újra kezeltük. Az egereket az utolsó kezelés után 72 órával túlaltattuk és megvizsgáltuk a BAL folyadékok sejttözetét. (B) Az AA+NAC hatékonyan gátolja a második RWE kezelés által kiváltott felerősödését a légúti gyulladásnak a lecsengő fázisban is. Az egereket a korábban leírtak szerint RWE-tal szenzitizáltuk és intranazálisan kezeltük, majd a második kezelést (RWE vagy RWE+AA+NAC) 10 nappal az első után végeztünk el. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

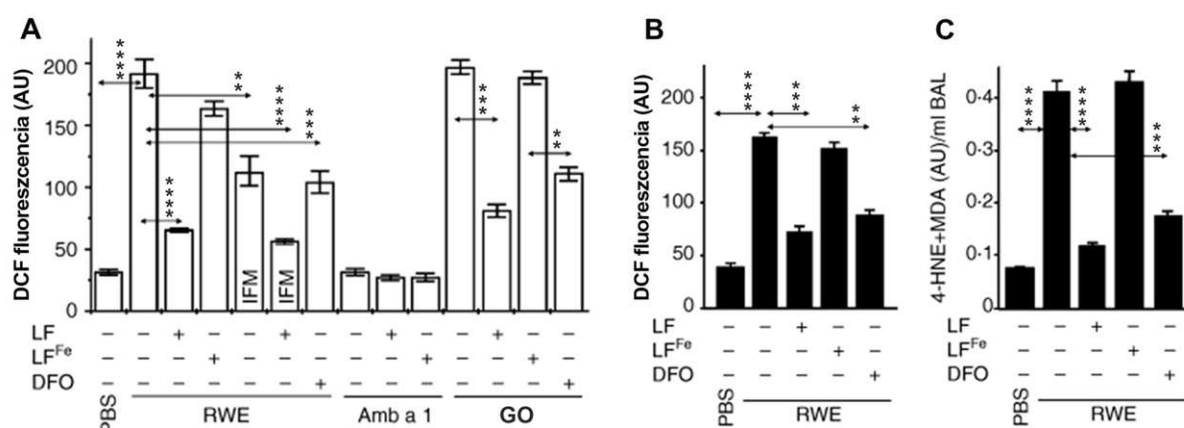
Számos tanulmány beszámolt már arról, hogy asztmás betegekben az antioxidánsok szintje alacsonyabb, mint az egészséges kontrollokban [243-245]. Sőt, csupán egyetlen akut asztma roham alatt is szignifikánsan csökken a szérumban az antioxidáns szintje [246]. Ennek megfelelően logikus terápiás lehetőségnek tűnik megpróbálni megemelni az antioxidánsok szintjét az asztmásokban. Azonban az antioxidánsok szájon át történő terápiás alkalmazása az asztmás tünetek enyhítésére, eddig nem bizonyult elég sikeresnek [245]. Ebben a kísérletsorozatban azt találtuk, hogy az antioxidánsok intrapulmonáris alkalmazása egerekben megnöveli a légutak antioxidáns kapacitását, azonban csak egy viszonylag szűk

időkereten belül (1,5 - 2 óra). A pollen expozícióval azonos időben adott antioxidánsok hatékonyan védték ki a pollen NAD(P)H oxidázok által termelt szabadgyökök gyulladást fokozó hatását. Ha azonban az antioxidánsokat 4, illetve 24 órával a RWE kezelést követően adtuk intranazálisan az egereknek, akkor már nem tudták gátolni az allergiás gyulladás kialakulását. Fontos kérdés volt annak tisztázása, hogy az antioxidánsok az allergiás gyulladást esetleg nem-specifikus módon gátolják-e, valamilyen biokémiai hatásukkal a légutakban. Ennek a lehetőségét sikerült kizárnunk, ugyanis az antioxidánsok nem akadályozták meg az OVA, egy nem-oxidáló allergén, által kiváltott allergiás légúti gyulladást. Ez azt mutatja, hogy az antioxidánsok specifikusan csak az oxidáló allergének által kiváltott légúti gyulladást képesek kivédeni. Az antioxidánsok gátolták a második RWE kezelést követő allergiás légúti gyulladás súlyosbodását is a késői, illetve a rezolúciós fázisban. Megfigyeléseink azt sugallják, hogy a terápiásan alkalmazandó antioxidánsoknak inkább a megelőzésben lehet szerepük, mintsem a már meglévő légúti allergiás gyulladás visszafordításában.

5.5 A laktoferrin csökkenti a pollen által indukált allergiás légúti gyulladás mértékét kísérletes állatmodellben

Korábban kimutattuk, hogy a pollen NAD(P)H oxidázok $O_2^{\bullet-}$ -t termelnek (5.1. fejezet). A $O_2^{\bullet-}$ -ből rövid idő alatt H_2O_2 keletkezhet enzimatis vagy nem-enzimatis úton is [247]. Fe^{2+} ionok jelenlétében a H_2O_2 molekulából rendkívül reakcióképes hidroxil-gyök ($OH^{\bullet}$) keletkezik (Fenton reakció: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$) (30. ábra) [248], amely ellen közvetlen enzimatis védekező mechanizmus nincs. Ebben a tanulmányban a vas-megkötő tulajdonságú laktoferrin (LF) hatását vizsgáltuk a RWE által kiváltott oxidatív stresszre *in vitro* tenyésztett légúti hámsejtekben és a RWE által indukált légúti gyulladásra egerekben. Először is megvizsgáltuk a LF hatását a RWE által kiváltott intracelluláris ROS szintjének változásaira. Humán A549 sejteket 30 percig növesztettünk vas-tartalmú médiumban, amihez LF-t vagy vassal telített laktoferrint (LF^{Fe}) adtunk, majd a sejteket feltöltöttük H_2DCF -DA-tal. Ezután a sejteket 125 $\mu g/ml$ RWE + 100 μM NADPH-tal kezeltük, majd mértük a DCF fluoreszcencia változásait. A LF (100 $\mu g/ml$) jelenlétében szignifikánsan ($P < 0,0001$) kisebb DCF fluoreszcencia volt detektálható, a LF^{Fe} (100 $\mu g/ml$) viszont nem csökkentette jelentősen az intracelluláris DCF jelet (30. A ábra). A LF optimális koncentrációját előzetes kísérletekben határoztuk meg. Kontroll kísérleteinkben - ahol glükóz oxidázt (GO, 50 $\mu U/ml$) alkalmaztunk, ami elsődlegesen H_2O_2 -ot termel [249] -, LF jelenlétében szignifikánsan ($P < 0,001$) kisebb volt a DCF fluoreszcencia, míg a LF^{Fe} gyakorlatilag nem volt hatással az intracelluláris ROS mennyiségére. RWE kezelés hatására a vasmentes médiumban (iron-free medium, IFM) tenyésztett A549 sejtekben jóval alacsonyabb (kb. 35%-kal) volt a ROS szintje, mint a vastartalmú médiumban tenyésztett sejtekben (30. A ábra). Fontos megjegyezni, hogy a LF az IFM-ban tartott sejtekben is csökkentette a RWE által indukált ROS mennyiségét. A RWE-ban nagy mennyiségben található, de NAD(P)H oxidáz aktivitással nem rendelkező Amb a 1 allergén nem változtatta meg a celluláris ROS szintjét, sem LF, sem LF^{Fe} jelenlétében. Deferoxamin (DFO), egy szintén vas-megkötő tulajdonsággal rendelkező vegyület, kb. 40%-kal csökkentette a RWE által indukált ROS mennyiségét (30. A ábra). Eredményeink megerősítéséhez a kísérleteket NHBE sejteken is elvégeztük. Ahogy az a 30. B ábrán látható, a LF^{Fe} nem, viszont a LF lényegesen csökkentette a RWE által indukált ROS szintjét NHBE sejtekben is. A ROS, főleg a $OH^{\bullet}$ jól ismert tulajdonsága, hogy képes lipideket károsítani mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között [250]. A folyamat olyan aldehid-típusú végtermékeket eredményez, mint a 4-HNE vagy a MDA, amelyeket korábban kimutattunk a RWE-kezelt egerek BALF mintáiban (5.1. fejezet). Annak tisztázására, hogy vajon a LF *in vivo* is gátolja-e - vaskötő képessége révén -

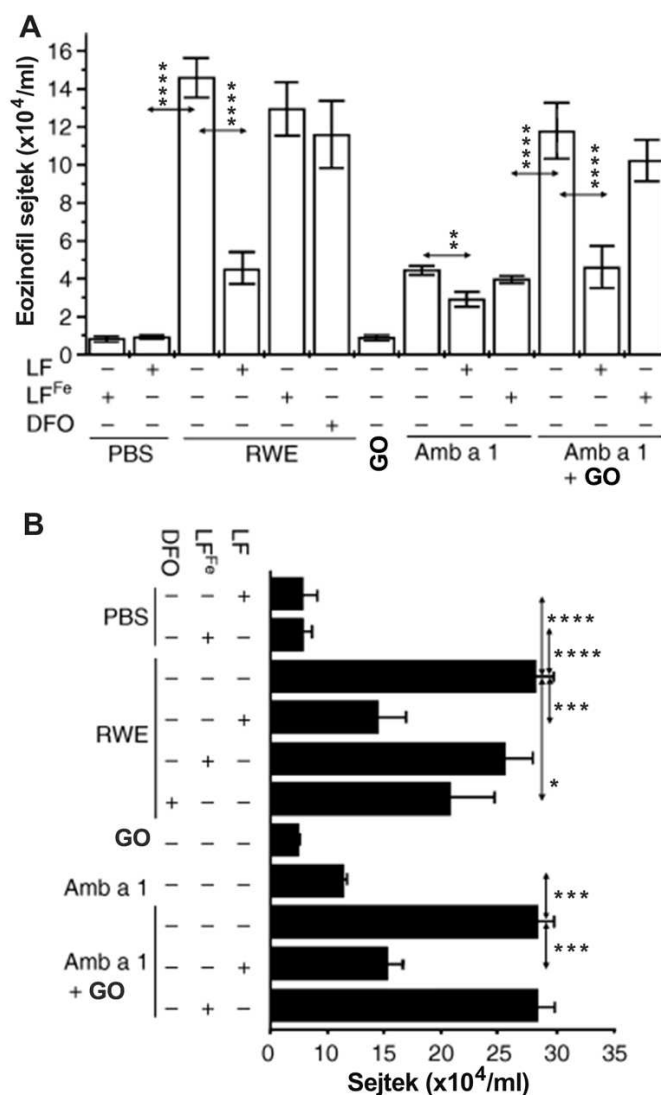
a $\text{OH}^\bullet$ kialakulását és az általa okozott lipidperoxidációs termékek keletkezését, meghatároztuk a 4-HNE és MDA szinteket intranazális RWE $\pm$ LF (vagy RWE $\pm$ DFO) kezelés után egerek BALF mintáiban. A BALF elemzése alapján a RWE kezelés jelentősen megnövelte a 4-HNE és MDA szinteket (**30. C ábra**). A LF és DFO is szignifikánsan gátolta ezt a növekedést, ami arra utal, hogy a légutakban is vas-mediált folyamat eredményezi a $\text{OH}^\bullet$ kialakulását a pollen eredetű $\text{O}_2^{\bullet-}$ -ből és a H_2O_2 -ből, és vezet az oxidált lipidszármazékok keletkezéséhez.



30. ábra. A LF csökkenti a RWE által indukált intracelluláris ROS szintjét tenyésztett sejtekben, valamint az oxidált lipidek mennyiségét a BAL folyadékban

(A) A549 sejteket $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ -tal töltöttünk fel 15 percig, majd RWE + NADPH-tal kezeltünk. Az intracelluláris DCF fluoreszcencia változását LF, LF^{FE} , vagy DFO jelenlétében és hiányában fluorimetriásan mértük. Pozitív kontrollként H_2O_2 -ot termelő GO-t használtunk. (B) A ROS szintjének változásai normál humán bronchiális epitélisejtekben. (C) A LF csökkenti a 4-HNE+MDA szinteket a RWE-kezelt egerek ($n = 5-8$) BAL folyadékában. Mindegyik adatpont 3 vagy több független kísérlet átlagát $\pm$ SEM reprezentálja. LF: laktoferrin; LF^{FE} : vassal telített laktoferrin; DFO: deferoxamin; RWE: parlagfű pollen kivonat; GO: glükóz oxidáz; DCF: diklorofluorescein; 4-HNE: 4-hidroxinonenal; MDA: malondialdehid; BAL: bronhoalveoláris mosófolyadék; AU: tetszőleges egység; IFM: vasmentes médium. $**P < 0,01$; $***P < 0,001$; $****P < 0,0001$.

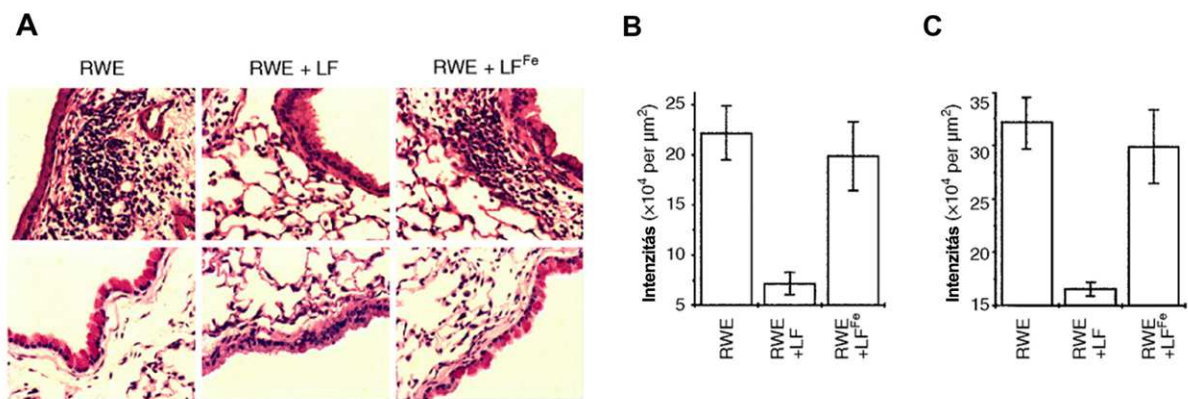
A következőkben a már korábban bemutatott egér modellt használtuk annak kiderítésére, hogy vajon a LF csökkenti-e a RWE által kiváltott allergiás légúti gyulladást. Amikor a RWE-szenzitized egereket intranazálisan RWE-tal kezeltük (100 μg /kezelés), erőteljes légúti gyulladás alakult ki, a légutak lumenében és a szubepitélialis területeken akkumulálódott gyulladásozó sejtek száma alapján (**31. A és B; 32. ábra**).



31. ábra. A LF csökkenti a RWE által indukált légúti gyulladást

Az eozinofilek (A) és az összes gyulladásos sejt (B) számát 72 órával a RWE kezelés után határoztuk a BAL folyadékból ($n = 6-8$ egér/csoport). Az eredményeket átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk. LF: laktoferrin; LF^{FE}: vassal telített laktoferrin; DFO: deferoxamin; RWE: parlagfű pollen kivonat; GO: glükóz oxidáz. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Az egerek BALF mintái a RWE kezelést megelőzően elsősorban makrofágokat/monocitákat ($99 \pm 0,9\%$), valamint alacsony számban eozinofil granulocitákat ($0,1 \pm 0,05\%$) és neutrofil granulocitákat ($0,1 \pm 0,05\%$) tartalmaztak. A gyulladás kialakulása után a sejtek $47 \pm 6,2\%$ -a volt eozinofil granulocita, $52 \pm 3,8\%$ -a makrofág/monocita és $1 \pm 0,2\%$ -a neutrofil granulocita. Amikor a RWE-ot együtt adtuk LF-nel ($100 \mu\text{g}$) a gyulladásos sejteknek csak kismértékű akkumulációját figyeltük meg a BAL kompartmentben (31. A és B ábra) és a szubepitéliumban (32. A ábra).



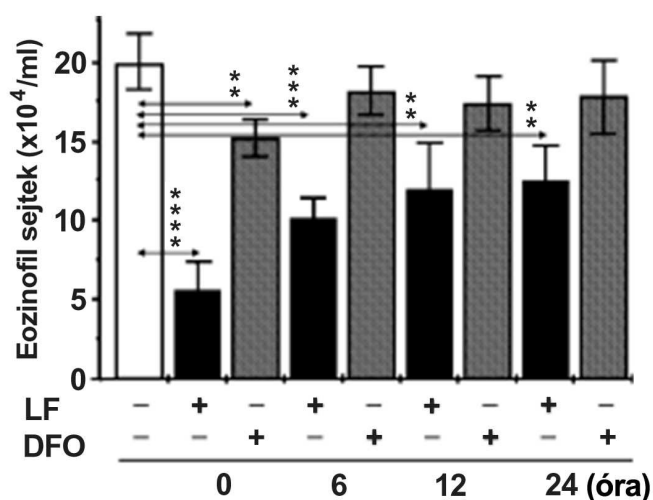
32. ábra. A LF hatása a RWE által indukált gyulladásos sejt akkumulációra a szubepitéliumban és a kehelysejt metapláziára a légúti hámban

(A) Az eozinofil infiltráció és a kehelysejt metaplázia mikroszkópos képe. Az egereket 72 órával a RWE kezelés után túlaltattuk, a tüdejüket kivettük, fixáltuk, és szövettani metszeteket készítettünk. A metszeteket hematoxin-eozin és PAS festéssel is megfestettük. Felső panelek: gyulladásos sejt infiltráció a peribronchiális és a perivaszkuláris régiókban. Alsó panelek: kehelysejt metaplázia. A képek 7 egér/csoport tüdejéből készült sorozatmetszeteket reprezentálnak. (B) A peribronchiális gyulladásos sejt infiltráció morfológiai számszerűsítése. (C) A kehelysejt metaplázia morfológiai számszerűsítése. LF: laktoferrin; LF^{FE}: vassal telített laktoferrin; RWE: parlagfű pollen kivonat.

A LF jelenléte szintén lényegesen csökkentette a RWE kezelés által kiváltott metapláziáját a mucin-termelő kehelysejteknek (32. A és C ábra). A LF^{FE}-nek nem volt statisztikailag szignifikáns hatása (31. A és B; 32. A-C ábra). Amikor DFO-t adtunk a RWE-hoz a gyulladás csak kissé csökkentését tapasztaltuk (31. A és B ábra). Az oxidációs szempontból inaktív Amb a 1 (25 μg) csak enyhe légúti gyulladást váltott ki (31. A és B ábra). Meglepő módon, a LF lényegesen erősítette az Amb a 1 által kiváltott gyulladást is, amíg a LF^{FE} hatástalan volt. Amikor az Amb a 1 allergént a ROS-generáló GO-zal együtt adtunk, az eozinofilek akkumulációja a légutak lumenében szignifikánsan megnövekedett. A GO önmagában nem okozta a gyulladásos sejtek bevándorlását a légutakban (31. A és B ábra). Amennyiben az egereknek GO+Amb a 1+LF-t adtunk együttesen, lényegesen kevesebb gyulladásos sejt volt kimutatható a BAL folyadékban (31. A és B ábra). Ezzel szemben a LF^{FE} nem mutatott statisztikailag szignifikáns hatást.

Annak tisztázására, hogy vajon a LF csupán a RWE kezelés által indukált oxidációs folyamatokra hat, vagy valamilyen más mechanizmussal is képes a kialakuló gyulladást

befolyásolni, LF-t (vagy DFO-t) adtunk RWE-tal szimultán (0 h) vagy 6, 12, 24 órával a RWE kezelés után. Ahogy az a **33. ábrán** látható a LF leghatékonyabban az együttes beadáskor (0 óra) fejtette ki hatását. Azonban, amikor a LF-t 6, 12, vagy 24 órával a RWE kezelés után adtuk, akkor is csökkentette a gyulladásos sejtek beáramlását a légutakba, bár kisebb mértékben (**33. ábra**). A RWE-tal egy időben beadott DFO sokkal kevésbé volt hatékony, mint a LF, és a későbbi időpontokban történő DFO kezelésnek nem volt hatása. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a LF képes gátolni a gyulladás korai lépéseit, de befolyásolhat más, későbbi eseményeket is a légúti gyulladás folyamatában a vaskötéstől független mechanizmussal.



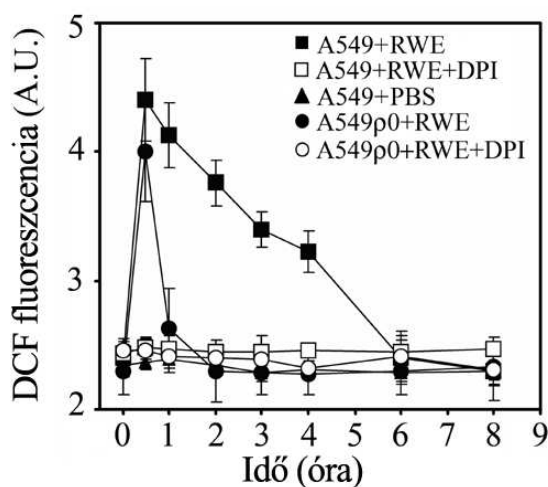
33. ábra. Az allergén-kezeléssel egy időben alkalmazott laktoferrin a leghatékonyabb

Az eozinofilek számát a BAL folyadék mintákban 72 órával a RWE kezelés után határoztuk meg ($n = 6-8$ egér/csoport). Az eredményeket átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk. LF: laktoferrin; DFO: deferoxamin. $**P < 0,01$; $***P < 0,001$; $****P < 0,0001$.

Eredményeink egybevágnak azokkal a megfigyelésekkel, amelyek szerint a LF hatékonyan gátolja az IgE-közvetített hisztamin felszabadulást a hízósejtekből [251], valamint hatásos inhibítora az aktivált hízósejtek által kibocsátott triptáznak is [252]. Ezen kívül a LF képes gátolni az eotaxin által kiváltott migrációját az eozinofil sejteknek [253]. Érdekes megfigyelés, hogy poratkával szenzitizált egyéneknél a LF koncentráció szignifikánsan alacsonyabb az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva, és ez, a poratkaspecifikus IgE ellenanyagok jelenlétével együtt, egy lehetséges szerológiai marker lehet az allergiás rhinitis korai felismeréséhez, még a klinikai tünetek kialakulása előtt [254]. Megfigyeléseink és más munkacsoportok eredményei alapján a LF alkalmazása ígéretes lehet a humán allergiás gyulladások kezelésére.

5.6. A már korábban kialakult mitokondriális működési zavar a légúti hámban súlyosbítja az allergiás gyulladást

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy oxidáns tulajdonságú anyagok belélegzése (pl. ózon, cigarettafüst, stb.) a mitokondriumok károsodását eredményezhetik a légutakban [255-257]. Saját eredményeink (**29. ábra**) és korábbi tanulmányok szerint [258], amennyiben egy szűk időkereten belül ismételt pollen expozíció történik a légutakban, ez felerősíti az antigénnel szembeni allergiás válaszreakciókat. Ezek a megfigyelések felvetik annak a lehetőségét, hogy a mitokondriumok oxidatív károsodása a légúti hámban, szerepet játszhat az immunrendszer fokozott válaszkészségének kialakulásában az ismételt antigén stimulusok során. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk feltételezésünk helyességét, először azt teszteltük, hogy a pollen NAD(P)H oxidázok által termelt szabadgyökök képesek-e oxidatív károsodást kiváltani a hámsejtek mitokondriumaiban. Amikor RWE-t adtunk A549 sejtekhez, egy gyors emelkedés volt detektálható az intracelluláris ROS szintjében, majd egy elhúzódó oxidatív stressz alakult ki a sejtekben. Az intracelluláris ROS-szintek csak 6 órával a RWE kezelés után estek vissza az alapszintre (**34. ábra**).

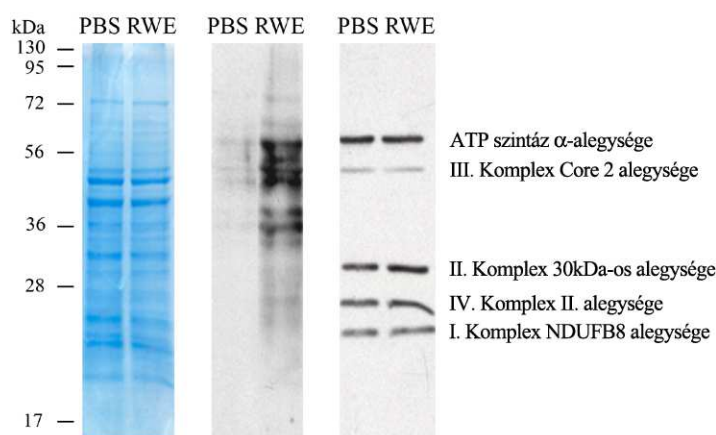


34. ábra. A működő mitokondriumokkal rendelkező hámsejtek RWE kezelése az intracelluláris ROS szintjének elhúzódó megemelkedéséhez vezet

Légúti hámsejteket (A549) és mitokondriális DNS-től mentes A549p0 sejteket H_2DCF -DA-tal töltöttünk fel, majd 100 $\mu g/ml$ RWE-tal kezeltünk egy NADPH oxidáz inhibitor (DPI) jelenlétében vagy hiányában. Az intracelluláris DCF fluoreszcenciát flow citometriával határoztuk meg. Az adatpontok 3 független kísérlet átlagát jelölik. RWE: parlagfű pollen kivonat; DPI: difenilén-jodónium.

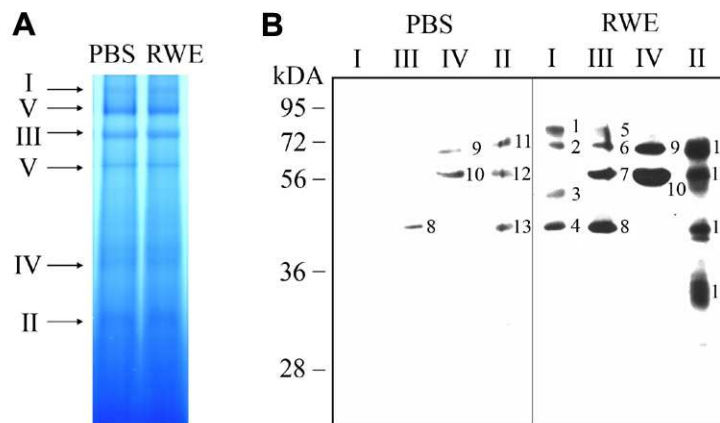
Azokban a sejtekben, amelyekben nem voltak működő mitokondriumok (A549p0) - krónikus etídiüm bromid kezelés hatására [5] -, a RWE kezelést követően az oxidatív burst csak átmeneti volt, kb. 1 órán át tartott (**34. ábra**). Egy NADPH oxidáz inhibitor (DPI, 100 μ M) hozzáadása a RWE-hoz meggátolta a ROS szintjének emelkedését mind az A549, mind az A549p0 sejtekben (**34. ábra**). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a hámsejtek RWE kezelése a mitokondriumok fokozott és elhúzódó ROS termeléséhez vezet.

A következőkben mitokondriumokat izoláltunk és tisztítottunk PBS-, és RWE-kezelt sejtekből. Először is megvizsgáltuk az oxidatív módon módosított fehérjék általános szintjében bekövetkezett változásokat (**35. ábra**). A RWE-kezelt sejtekből izolált mitokondriumok lizátumaiban a karbonilált fehérjék emelkedett mennyiségét detektáltuk a PBS-kezelt kontroll sejtekből származó mitokondriumok lizátumaihoz képest. Ezután a mitokondriális légzési lánc komplexeit izoláltunk kék natív PAGE-en (**36. A ábra**), 4-dinitrofenilhidrazinnal (DNPH) derivatizáltuk, majd a fehérjéket 10%-os SDS-PAGE-en szeparáltuk és a károsodott proteinek anti-dinitrofenil (DNP) ellenanyaggal tettük láthatóvá. A RWE-kezelt sejtekben a karbonilált fehérjék mennyisége megnövekedett mind a mitokondriális légzési lánc komplexeiben, mind a hozzájuk kapcsolódó fehérjékben a kontroll sejtekhez képest (**36. B ábra**).



35. ábra. A parlagfű pollen kivonattal (RWE) kezelt hámsejtek mitokondriumaiban megnő a karbonilált proteinek szintje

A PBS-, és a RWE-kezelt (100 μ g/ml) hámsejtekből izolált mitokondriumokat tisztítottuk, majd a mitokondrium lizátumokat derivatizáltuk DNPH-nal és megfuttattuk SDS-PAGE-en (bal panel). Blottolás után az oxidatív módon károsodott fehérjéket DNP-specifikus ellenanyaggal mutattuk ki (középső panel). Párhuzamos kísérletekben a légzési lánc komplexek relatív mennyiségét a mitokondrium preparátumokban OXPHOS monoklonális ellenanyagok segítségével (jobb panel) analizáltuk. A bemutatott eredmények 3 független kísérletet reprezentálnak.



36. ábra. A mitokondriumok légzés lánc komplexeiben található karbonilált fehérjék kimutatása és azonosítása

(A) PBS-, és RWE-kezelt (100 $\mu\text{g/ml}$) sejtekből mitokondriumokat izoláltunk. Egyenlő mennyiségű mitokondrium lizátumokat futtattunk meg kék natív PAGE-en és izoláltuk a légzési lánc komplexeket. (B) A komplexeket (I-IV) kimetszettük a kék natív gélből és DNPH-nal derivatizáltuk mielőtt 10%-os SDS-PAGE-en szeparáltuk volna az alegységeiket. A karbonilált fehérjéket anti-DNP ellenanyaggal tettük láthatóvá. Az oxidatíván károsodott fehérjéket MALDI-TOF/MS analízissel azonosítottuk (III. Táblázat). RWE: parlagfű pollen kivonat.

Az I. komplexben az anti-DNP ellenanyag nem mutatott ki semmilyen károsodott fehérjét PBS kezelésnél, míg 4 karbonilált proteint detektált a RWE-kezelt sejtekből származó mitokondriumok esetén (36. B ábra, jobb oldali panel, 1-4). A III. komplexben 3 fehérje károsodását eredményezte a RWE kezelés (36. B ábra, jobb oldali panel, 5-7). A IV. komplexben csak mennyiségi különbségek voltak karbonilált fehérjék szintjében a kétféle kezelés hatására (36. B ábra). A RWE kezelés következtében a karbonilált fehérjék szintje tovább növekedett, és még egy 31 kDa-os fehérje is károsodott a II. komplexben (36. B ábra, jobb oldali panel, 14).

Az oxidatíván károsodott fehérjék MALDI-TOF/MS analízise azonosított két NADH-dehidrogenáz (ubikinon) Fe-S proteint (NDUFS1 és NDUFS2), amelyek az I. komplex katalitikus magjának részei (III. Táblázat és 36. ábra). A III. komplex szerkezetének kialakításában résztvevő ubikinol-citokróm c redukáz 1-es és 2-es magfehérjék (UQCRC1 és UQCRC2) szintén a károsodott fehérjék között voltak (III. Táblázat és 36. ábra). Nem találtunk karbonilált elektrontranszport fehérjéket sem a II., sem a IV. komplexben. Minden kísérletben azonosítottunk olyan károsodott fehérjéket is, amelyek a légzési lánc komplexeivel együtt vándoroltak. Ilyenek voltak pl. a 75 kDa-os glükóz-szabályozott fehérje

(GRP75; III. komplex), a HSP70 hősokk fehérje (I-IV. komplexek), a HSP60 (II. és IV. komplexek), a citrát szintetáz (CISY; II. komplex), valamint feszültség-szabályozott anion szelektív csatorna 1 (VDAC1; I. komplex) (III. Táblázat és 36. ábra). Mindegyik azonosított, károsodott fehérje a sejtmagban kódolt, a génjeik kromoszómán való elhelyezkedését a III. Táblázatban tüntettük fel.

III. Táblázat. Az oxidatíván károsodott fehérjék azonosítása a RWE-kezelt hámsejtek mitokondriumaiban

Protein sáv No. ^a	Rövidített név	Protein neve	Gén lokalizáció	Molekula tömeg (kDa)	E érték ^b	Swiss-Prot azonosító	Funkció	Légzési lánc komplex	Lokalizáció a mitokondriumban
1	NDUFS1	NADH dehidrogenáz (ubikínon) Fe-S	2q33-q34	75	7.3×10^{-12}	P28331	Elektron transzport	I	Belső membrán
3	NDUFS2	NADH dehidrogenáz (ubikínon) Fe-S	1q23	49	1.5×10^{-11}	O75306	Elektron transzport	I	Belső membrán
7	UQCRC1	Ubikínol-citokróom c redukáz core 1	3p21.3	52	8.7×10^{-46}	P31930	Strukturális protein	III	Belső membránhoz asszociált
4, 8	UQCRC2	Ubikínol-citokróom c redukáz core 2	16p12	48	9.2×10^{-45}	P22695	Strukturális protein	I, III	Belső membránhoz asszociált
5	GRP75 ^c	75 kDa-os glükóz-szabályozott protein	5q31.1	74	6.9×10^{-19}	P38646	Chaperon	III	Külső membrán
2, 6, 9, 11	HSP70 ^c	Hősokk protein 70	5q31.1	74	3.5×10^{-29}	Q8N1C8	Chaperon	I, II, III, IV	Belső membránhoz asszociált
10, 12	HSP60 ^c	Hősokk protein 60	2q33.1	61	3.7×10^{-28}	Q96R14	Chaperon	II, IV	Mátrix
13	CISY ^c	Citrát szintáz	12q13.2-q13.3	52	6.9×10^{-19}	O75390	Krebs ciklus	II	Mátrix
14	VDAC1 ^c	Feszültség-függő anion-szelektív csatorna protein 1	5q31	31	4.4×10^{-18}	P21796	Ion transzport	II	Külső membrán

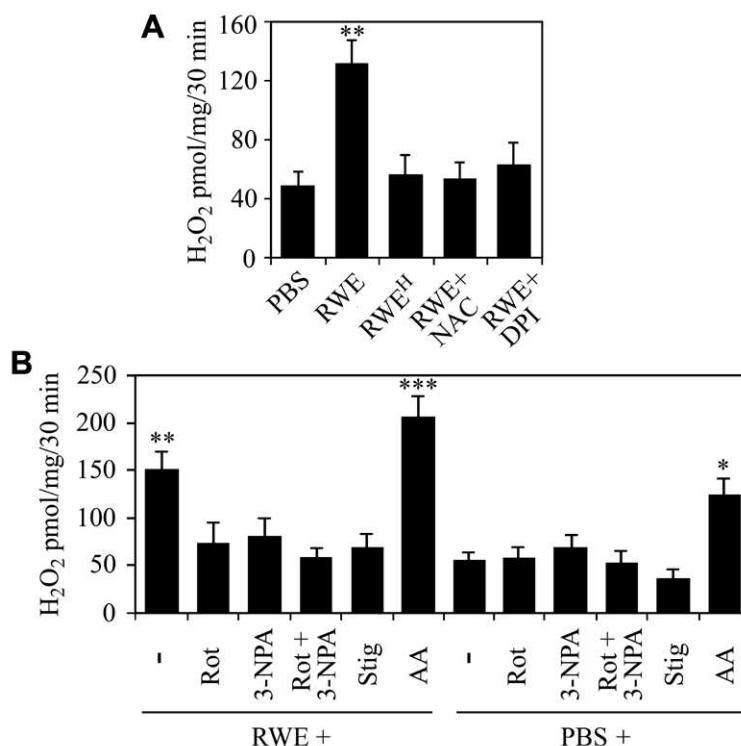
^aA protein sávok lokalizációja a 36. ábrán látható.

^bE érték: a Mascot adatbázisból származó mérőszám, amely megadja annak a valószínűségét, hogy a keresés során kapott találatok csupán a véletlennek köszönhetőek.

^cEzek a fehérjék a légzési lánc komplexeivel együtt vándoroltak a kék natív PAGE-en.

Abból a célból, hogy feltárjuk a funkcionális következményeit a mitokondriális fehérjék oxidatív károsodásának, meghatároztuk a PBS-, és a RWE-kezelt sejtek izolált mitokondriumaiból felszabadult ROS szintjét. Az mitokondriumból származó elsődleges szabadgyökök a $O_2^{\bullet-}$, ami gyorsan átalakul H_2O_2 -dá akár enzimatis, vagy nem-enzimatis úton [247]. A RWE-kezelt sejtekből nyert mitokondriumok szignifikánsan több H_2O_2 -ot állítottak elő, mint a PBS-kezelt sejtekből származóak (37. A ábra). Kontroll kísérleteinkben a sejteket hőinaktivált RWE-tal kezeltük, illetve RWE-tal DPI (100 μ M) vagy antioxidáns (3 órási előkezelés 10 mM NAC oldattal) jelenlétében. Ezekből a sejtekből származó mitokondriumok H_2O_2 termelése közel állt az alapszinthez. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a korábbi megfigyeléssel, hogy a mitokondriumok oxidatív károsodása megnövekedett ROS termeléshez vezet [259]. Az I. komplex (rotenon, 10 μ M) vagy a II. komplex (3-nitro-propionsav /3-NPA/; 3 mM) működésének gátlásával szignifikánsan csökkenthető volt a mitokondriumok H_2O_2 termelése (37. B ábra). A rotenon és 3-NPA kombinációja közel az alapszintre csökkentette a keletkező H_2O_2 mennyiségét (37. B ábra), ami azt sugallta, hogy az I. és II. komplex működése szükséges a fokozott ROS termeléshez. A stigmatellin, ami alacsony koncentrációban (0,06 μ M) meggátolja az elektron belépését a III. komplex Qo centrumába [260] teljesen megszüntette, míg az

elektrontranszfert a III. és a IV. komplexek között megakadályozó Antimycin A (10 μ M) [5] tovább fokozta a RWE-indukált mitokondriális H_2O_2 termelést. Ez arra utal, hogy a RWE-kezelt hámsejtekben a légzési lánc III. komplexe a legvalószínűbb forrása a megnövekedett mitokondriális ROS termelésnek (37. B ábra).

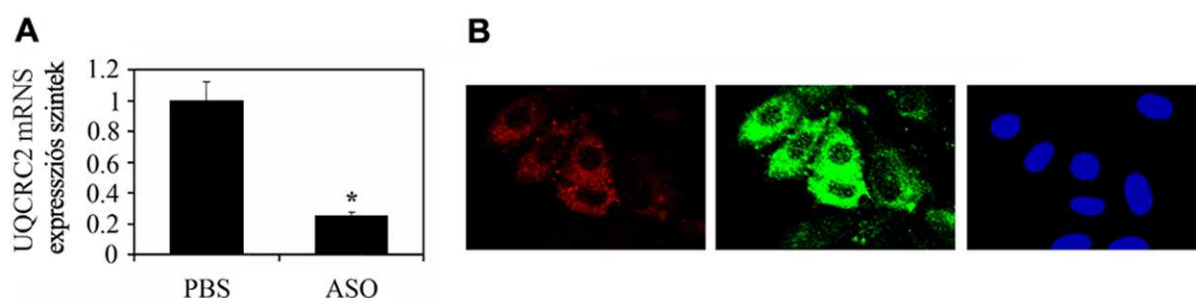


37. ábra. A RWE-kezelt sejtekből származó mitokondriumok több H_2O_2 -ot termelnek, mint a PBS-kezelt sejtekből izoláltak

(A) A sejtek előkezelése antioxidánssal (NAC), vagy a RWE előzetes hőkezelése (RWE^H) vagy DPI, egy NADPH oxidáz inhibitor, jelenléte megszünteti a RWE azon képességét, hogy indukálja a mitokondriumok fokozott ROS termelését. (B) A légzés lánc III. komplexe a RWE által indukált ROS termelődés fő helye. Rotenon (Rot), 3-nitro-propionsav (3-NPA), vagy stigmatellin (Stig) hozzáadása a mitokondriumokhoz lecsökkenti, viszont Antimycin A (AA) adása megnöveli a RWE-kezelés által indukált mitokondriális ROS termelődést. Az eredményeket 3 független kísérlet átlaga $\pm$ SEM formájában ábrázoltuk. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs PBS-kezelt sejtek mitokondriumaiból származó H_2O_2 . RWE: parlagfű pollen kivonat; DPI: difenilén-jodónium.

Az oxidatíván károsodott mitokondriális fehérjék kisebb aktivitással rendelkeznek és enzimatikusan lebomlanak [261]. Mivel megfigyeléseink szerint a RWE-kezelt sejtekben a III. komplex a felelős a fokozott ROS termelésért, és a kezelés által indukált celluláris oxidatív

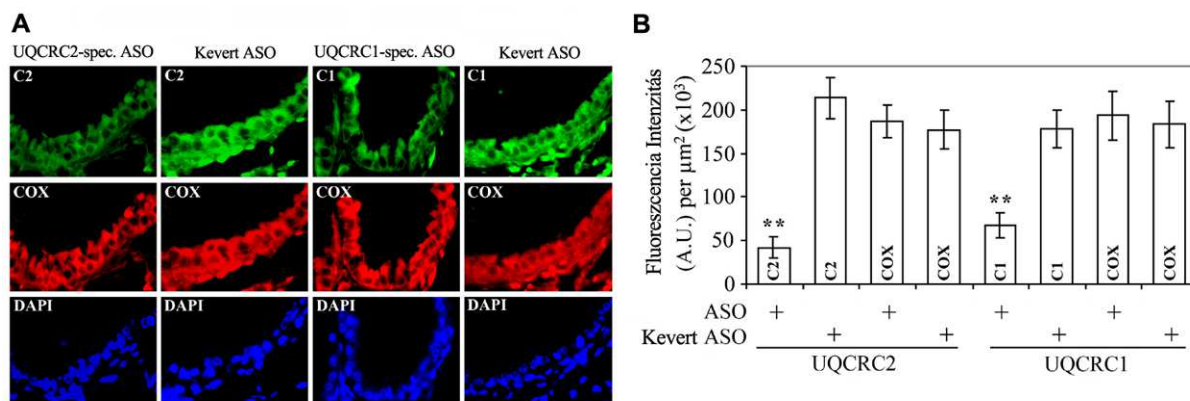
stressz a III. komplexben az UQCRC1 és az UQCRC2 fehérjét károsította, a továbbiakban megvizsgáltuk, hogy milyen következményekkel jár ezeknek a fehérjéknek az alacsonyabb szintje a mitokondriális ROS termelésre. Az oxidatív károsodás, vagyis a csökkent funkciók modellezésére antiszensz oligonukleotidok (ASO) felhasználásával lecsökkentettük az mRNS-szintjüket egér tüdő adenoma sejtekben (LA-4). Az ASO kezelés hatékonyságát kvantitatív RT-PCR-rel határoztuk meg. Az eredmények, a sejt kultúra transzfekciós hatékonyságával korrigálva, azt mutatták, hogy az ASO kezelés gátolta a fehérjék mRNS szintű expresszióját >80%-kal (**38. A ábra**). A hatékonyan transzfektált sejtekben (Texas Red jelölésű ASO-at használtunk a transzfektált sejtek azonosításához) *in situ* mikroszkópos elemzéssel vizsgáltuk a ROS szintjében bekövetkező változásokat. Az intracelluláris ROS mennyiségének megváltozását $H_2DCF\text{-}DA$ festék felhasználásával követtük nyomon. A mikroszkópos felvételekből kiderült, hogy csak a Texas Red-pozitív sejtek mutattak működési zavart, azaz megnövekedett DCF szignált, az UQCRC2-specifikus ASO-kal transzfektált sejtenyészetben (**38. B ábra**). Hasonló kísérletben az UQCRC1-specifikus ASO-kal transzfektált sejtekben nem nőtt meg az intracelluláris DCF fluoreszcencia. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a funkcionális UQCRC2 szint lecsökkenése okozta a mitokondrium működési zavarát és vezetett fokozott ROS termeléshez.



38. ábra. Az UQCRC2 kifejeződésének gátlása antiszensz oligonukleotidokkal megnöveli az intracelluláris ROS szintjét

(A) Az UQCRC2 kifejeződésének gátlása ASO-kal lecsökkentette a fehérje expresszióját mRNS szinten >80%-kal az LA-4 sejtekben. (B) Megnövekedett az intracelluláris ROS-szint azokban a sejtekben, amelyekben hatékony volt a transzfekció UQCRC2-specifikus ASO-kal. A sejteket Texas Red jelölésű ASO-kal transzfektáltuk és az intracelluláris ROS szintjében bekövetkező változásokat $H_2DCF\text{-}DA$ -tal vizsgáltuk fluoreszcens mikroszkóp segítségével. A transzfektált sejt kultúrában csak a vörösen (Texas Red) fluoreszkáló sejtek mutattak emelkedett DCF szignált (zöld fluoreszcencia). UQCRC2: ubikinol-citokróm c reductáz 2-es magfehérje; ASO: antiszensz oligonukleotidok; * $P < 0,05$ vs kontroll sejtek.

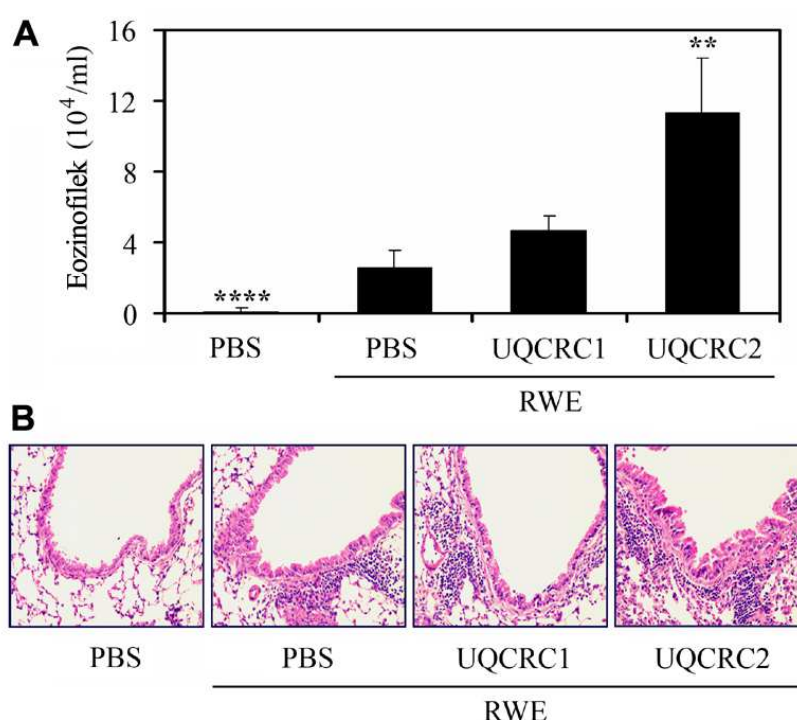
A következőkben megvizsgáltuk, hogy vajon a mitokondriumok már létező funkciójavara súlyosbítja-e az allergiás légúti gyulladást. A tervünk az volt, hogy azt a természetben is előforduló állapotot modellezzünk, amikor olyan egyedeket ér pollen expozíció, akiknek a légútjaiban a környezetből származó oxidánsok már mitokondriális funkciót zavaró ideztek elő. A mitokondriális funkciózavar előidézéséhez intranazális ASO kezeléssel gátoltuk az UQCRC2 expresszióját a szentitizált egerekben. Az UQCRC2 szintjét a tüdőben immunfluoreszcens módszerrel határoztuk meg. Az UQCRC2 kifejeződésének lokális csökkenését figyeltük meg a bronchiális epitéliumban (**39. ábra**), ami azonban a mitokondriumban szintetizált citokróm c oxidáz IIb alegységének expresszióját nem érintette (**39. ábra**). Ez arra utal, hogy az ASO kezelés nem változtatta meg számottevően a mitokondriumok számát a légúti hámsejtekben.



39. ábra. A mitokondriális légzési lánc III. komplex magfehérjék expressziójának gátlása helyi ASO kezeléssel

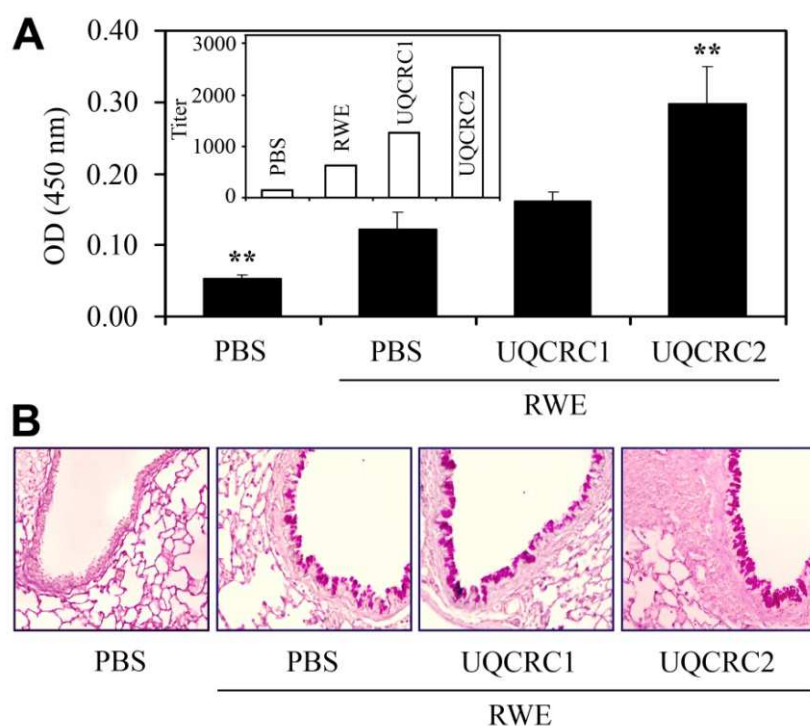
(A) A RWE-szenzitizált egerek intranazális ASO kezelése után az állatokat túlaltattuk, a tüdőket kivettük, és az UQCRC1, valamint az UQCRC2 expresszióját a tüdő metszetekben fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk. A bronchiális epitéliumban mind az UQCRC1, mind az UQCRC2 kifejeződésének lokális csökkenése volt megfigyelhető, ami azonban a mitokondriumban szintetizált citokróm c oxidáz IIb alegységének az expresszióját nem befolyásolta. A kontroll, kevert ASO kezelés nem módosította sem a magfehérjék, sem a citokróm c oxidáz IIb alegységének expresszióját. (B) Az UQCRC1 és az UQCRC2 kifejeződésének mennyiségi meghatározása légúti hámsejtekben, specifikus ellenanyaggal jelölt tüdő metszetek fluoreszcens szignáljainak mérésével. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM formájában ábrázoltuk ($n = 3-4$ egér/csoport). ASO: antiszensz oligonukleotidok; A.U.: tetszőleges egység; UQCRC1: ubikinol-citokróm c reduktáz 1-es magfehérje; UQCRC2: ubikinol-citokróm c reduktáz 2-es magfehérje; C1: UQCRC1; C2: UQCRC2; COX: citokróm c oxidáz IIb alegysége. $**P < 0,01$ vs kontroll, kevert ASO kezelés.

Az UQCRC2-t alacsony szinten kifejező egereket RWE-tal intranazálisan kezeltük és 72 óra múlva meghatároztuk az allergiás gyulladás mértékét. Ezeknek az egereknek a BALF mintáiban az eozinofil sejtek száma 4,4-szer volt nagyobb, a csak RWE-tal kezelt kontroll állatokhoz képest (**40. A ábra**). Az UQCRC2 expressziójának gátlása a RWE kezelés előtt megnövelte a gyulladásos sejtek akkumulációját a peribronchiális régiókban is (**40. B ábra**). A RWE kezelés önmagában is a gyulladásos sejtek számának jelentős megemelkedését okozta a BALF mintákban a PBS kezeléshez viszonyítva. Az UQCRC1 alacsonyabb szintű kifejeződése nem növelte meg szignifikánsan az eozinofilek beáramlását a légutakba (**40. ábra**). A kontroll állatokban a mitokondriális funkciózavar önmagában nem növelte meg sem az eozinofilek, sem más gyulladásos sejtek számát a peribronchiális területeken (**40. ábra**).



40. ábra. Az UQCRC2 kifejeződésének gátlásával kiváltott mitokondriális funkciózavar a légutak hámsejtjeiben felerősíti a gyulladásos sejtek beáramlását RWE kezelés után
 Az UQCRC1-specifikus ASO nem, viszont az UQCRC2-specifikus ASO kezelés megnöveli az eozinofil granulociták számát a BALF mintákban (A) és a gyulladásos sejtek számát a peribronchiális területen (B) a RWE-kezelt egerekben. ASO: antiszensz oligonukleotidok; UQCRC1: ubikinol-citokróom c redukáz 1-es magfehérje; UQCRC2: ubikinol-citokróom c redukáz 2-es magfehérje; RWE: parlagfű pollen kivonat. ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$ vs PBS-, és RWE-kezelt egerek.

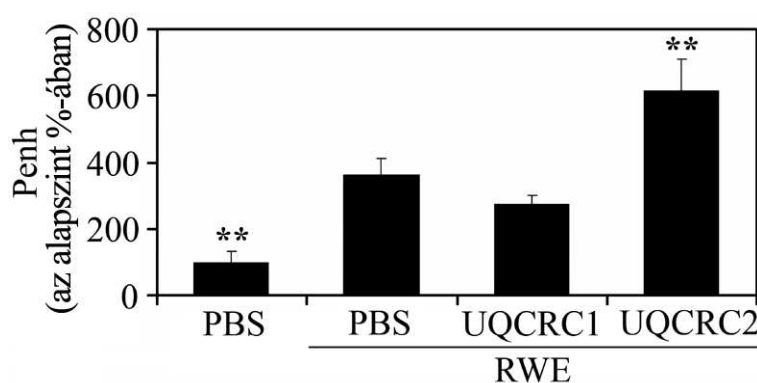
Az allergiás légúti gyulladás, valamint az asztma fontos kórtani jellegzetessége a mucint termelő sejtek felszaporodása és a fokozott mucin szekréció. Az allergiás gyulladás folyamán a légúti hámban a legnagyobb mennyiségben termelődő mucin, azaz a MUC5AC szintjét határoztuk meg a BALF mintákban ELISA-val. A MUC5AC szintje a BALF mintákban 2,4-szer magasabb volt a RWE-tal kezelt, UQCRC2 deficiens állatokban a csak RWE-kezelt állatokhoz képest (**41. A ábra**). Ahogyan az várható volt, az UQCRC2 csökkent kifejeződése szintén megnövelte a kehelysejtek metapláziáját a légutak epitéliumában (**41. B ábra**). Az UQCRC1 expressziójának gátlása a RWE kezelés előtti nem növelte meg szignifikánsan sem a MUC5AC mennyiségét a BALF mintákban, sem a kehelysejtek metapláziáját a csak RWE-kezelt kontroll állatokhoz képest (**41. ábra**). Az UQCRC1 és az UQCRC2 kifejeződésének gátlása önmagában nem váltott ki sem fokozott mucin termelést, sem a kehelysejtek metapláziáját.



41. ábra. Az UQCRC2 kifejeződésének gátlásával kiváltott mitokondriális funkciózavar a légutak hámsajtjeiben megnöveli a mucin termelődést RWE kezelés után

Az UQCRC1-specifikus ASO nem, viszont UQCRC2-specifikus ASO fokozta a MUC5AC mennyiségét a BALF mintákban (A) és a kehelysejtek metapláziáját (B) a légúti epitéliumban. Kis ábra: a mintákban mért MUC5AC végpont titerek. ASO: antiszensz oligonukleotidok; UQCRC1: ubikinol-citokróm c redukáz 1-es magfehérje; UQCRC2: ubikinol-citokróm c redukáz 2-es magfehérje; RWE: parlagfű pollen kivonat. ** $p < 0,01$ vs kontroll-, és RWE-kezelt egerek.

Ahogy az várható volt, a légúti hiperreaktivitás (amit a Penh index értéke fejez ki) megnövekedett mindegyik RWE-kezelte egér csoportban a PBS-kezelte kontroll állatokhoz képest (**42. ábra**). Azonban csak az UQCRC2 deficiens egerekben volt szignifikánsan magasabb ($P < 0,01$) a Penh index értéke, mint a csak RWE kezelést kapott egerekben (**42. ábra**). Az UQCRC1 kifejeződésének gátlása nem befolyásolta jelentős mértékben a légúti hiperreaktivitást a RWE kezelés után. A RWE kezelést nem kapott UQCRC1, valamint UQCRC2 deficiens egerek Penh index értéke hasonló volt fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll állatokéhoz (az adatokat nem mutatom).



42. ábra. Az UQCRC2 kifejeződésének gátlásával kiváltott mitokondriális funkciózavar a légutak hámsejtjeiben fokozza a légúti hiperreaktivitást RWE kezelés után

A légzési szünetekben bekövetkezett változásokat a növekvő koncentrációjú metakolin kezelése során (Penh index) teljes-test-pletizmográfiával mértük. UQCRC1: ubikinol-citokróm c redukáz 1-es magfehérje; UQCRC2: ubikinol-citokróm c redukáz 2-es magfehérje; RWE: parlagfű pollen kivonat. ** $p < 0,01$ vs PBS-, és RWE-kezelte egerek.

Ebben a vizsgálatban sikerült kimutatnunk, hogy a légúti hámokban már korábban kialakult mitokondriális működési zavar egy újabb allergén expozíció esetén súlyosabb allergiás gyulladást és bronchiális hiperreaktivitást eredményez. A környezeti oxidánsokra érzékeny mitokondriális proteinek azonosítása céljából A549 sejteket RWE-tal kezeltük. Az I. komplex katalitikus magjából származó NDUFS1 és NDUFS2 proteineket, valamint a III. komplexből származó UQCRC1 és UQCRC2 szerkezeti fehérjéket azonosítottuk, mint a mitokondriális légzési lánc oxidatíván sérült fehérjéit ezekben a sejtekben. A RWE-kezelte sejtekből izolált mitokondriumokra fokozott H_2O_2 termelés volt jellemző, ami arra utal, hogy a légzési lánc oxidatív károsodása és a mitokondriális működési zavar között közvetlen összefüggés van. A légzési lánc komplexeinek inhibitorait használtuk, hogy azonosítani tudjuk a ROS képződésének helyét az oxidatíván sérült mitokondriumokban. Eredményeink azt mutatják, hogy a rotenon (gátolja az elektron áramlását az ubiquinol kötő helyhez közel

az I. komplexben) és a 3-NPA (irreverzibilisen kötődik a szukcinát dehidrogenázhoz a II. komplexben) együttes használata gátolja a H_2O_2 keletkezését az RWE-kezelt sejtekből származó mitokondriumokban, ami azt jelzi, hogy az elektrontranszportlánc a ROS fő forrása, és nem az α -ketoglutarát a Krebs-ciklusban [262]. A stigmatellin (mikromólosnál kisebb koncentrációban blokkolja a III. komplexet a Qo helyen) szintén megszüntette a mitokondriális ROS képződését. Ezzel szemben az antimicin A, amely a III. komplex mátrix felőli oldalához kötődik, és gátolja a citokróm-c oxidoreduktáz Qi helyét a citokróm *b* alegységben [5], tovább növelte az RWE kezelés által indukált mitokondriális ROS termelést. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a III. komplex a ROS képződésének a fő helye az RWE-tal kezelt sejtek mitokondriumaiban, ezért a következő kísérletekben a III. légzési komplex 1. és 2. magfehérjéire koncentráltunk.

Az UQCRC1 és az UQCRC2 is a III. komplex mátrix felőli oldalához kötött, stabilizálja a III. komplexet, és peptidáz aktivitással rendelkezik [263]. Idős egerek veséjéből, vázizomzatából és szívéből származó mitokondriumok oxidatíván sérült fehérjei között korábban szintén azonosították az UQCRC1-t és az UQCRC2-t [264, 265]. Ezen kívül azt is kimutatták, hogy az UQCRC2 szerepet játszik az egeragy természetes öregedésében [266]. A patogénekkel szembeni immunválasz eredményeként kialakuló oxidatív stressz szintén oxidatív károsodást okoz ezekben a fehérjékben [267]. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a III. komplexben a magfehérjék a reaktív gyökök elsődleges célpontjai, és oxidatív károsodásuk esetén növekszik a mitokondriális ROS termelése.

A fehérjék oxidatív módosulása nagyon gyakran funkcióvesztéshez vezet, és a károsodott fehérjék degradációját eredményezi. Abból a célból, hogy utánozzuk az oxidatíván sérült UQCRC1 és UQCRC2 szintjének és/vagy funkciójának átmeneti csökkenését, a RWE expozíciót megelőzően ASO kezeléssel gátoltuk a kifejeződésüket hámsejtekben. Azt találtuk, hogy az UQCRC2 hiánya megnöveli a ROS szintjét a sejtekben, míg az UQCRC1 hiánya nem. Habár az UQCRC1 és UQCRC2 sok közös tulajdonsággal rendelkezik, úgy tűnik, hogy mégis különböző szerepet játszanak a III. komplex ubiquinol-citokróm c reduktáz aktivitásának fenntartásában. Más munkacsoportok is azt találták, hogy az UQCRC2 fontos szerepet játszik a belső membránpotenciál fenntartásában, és ebből következően a mitokondriális ROS képzésében [268]. A mitokondriális légzési lánc komplexeinek alegységei mellett, számos kiegészítő fehérje oxidatíván károsodását is kimutattuk a RWE-kezelt sejtek mitokondriumaiban. Habár ezek a fehérjék jelentős szerepet játszanak a mitokondriális integritás és funkció fenntartásában, nem vesznek közvetlenül részt a mitokondriális ROS termelésben.

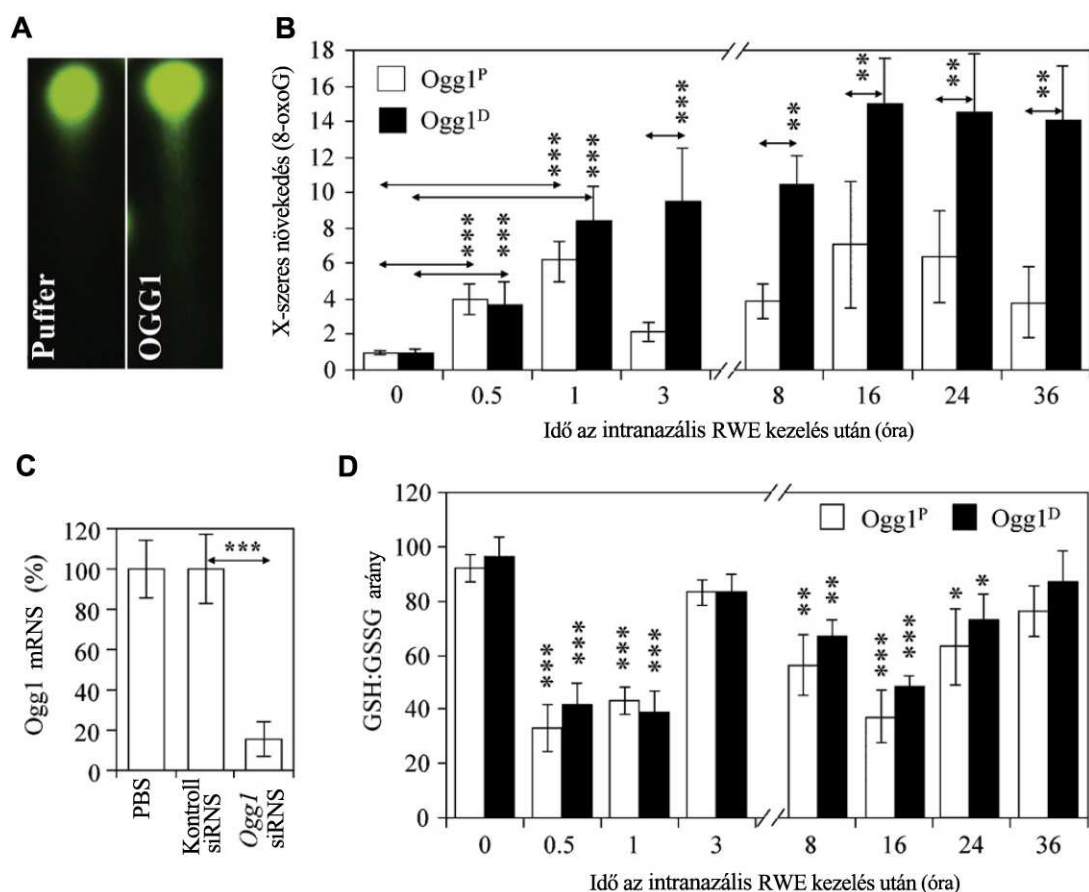
Korábbi megfigyelésekkel megegyezően, adataink azt mutatják, hogy a már meglévő mitokondriális működési zavar felerősíti az allergiás gyulladást. A mitokondriális károsodást indukáló ózon vagy légszennyező részecskék [256, 257] bejutása a légutakba az allergén

expozíció előtt szignifikánsan felerősíti az allergiás válaszokat [269, 270]. Amikor parlagfű szenzitizált betegek naponta kaptak pollenkezelést, az egymást követő napokon egyre kisebb adagokra volt szükség ahhoz, hogy ugyanolyan allergiás tüneteket váltsanak ki náluk [258]. Az orrnyálkahártyát érő ismételt pollen expozíciók szintén fokozták a más allergén vagy nem-allergén ingerek által kiváltott tüneteket [258]. Egy másik humán vizsgálat kimutatta, hogy ismételt pollen bejutás 3 nap után még fokozott allergiás klinikai tüneteket és gyulladásos sejt infiltrációt okozott, de 1 vagy 4 héttel később már nem [271].

Összefoglalásként megállapítható, hogy elsőként találtunk bizonyítékot arra, hogy a mitokondriumok speciális fehérjéit érő oxidatív károsodás, az antigén bejutását megelőzően, felerősíti a légúti eozonifiliát, növeli a mucin termelődést, valamint fokozza a bronchiális hiperreaktivitást.

5.7. A 8-oxoguanin DNS glikoziláz kifejeződésének gátlása a légúti hámban csökkenti az allergiás gyulladás mértékét a tüdőben

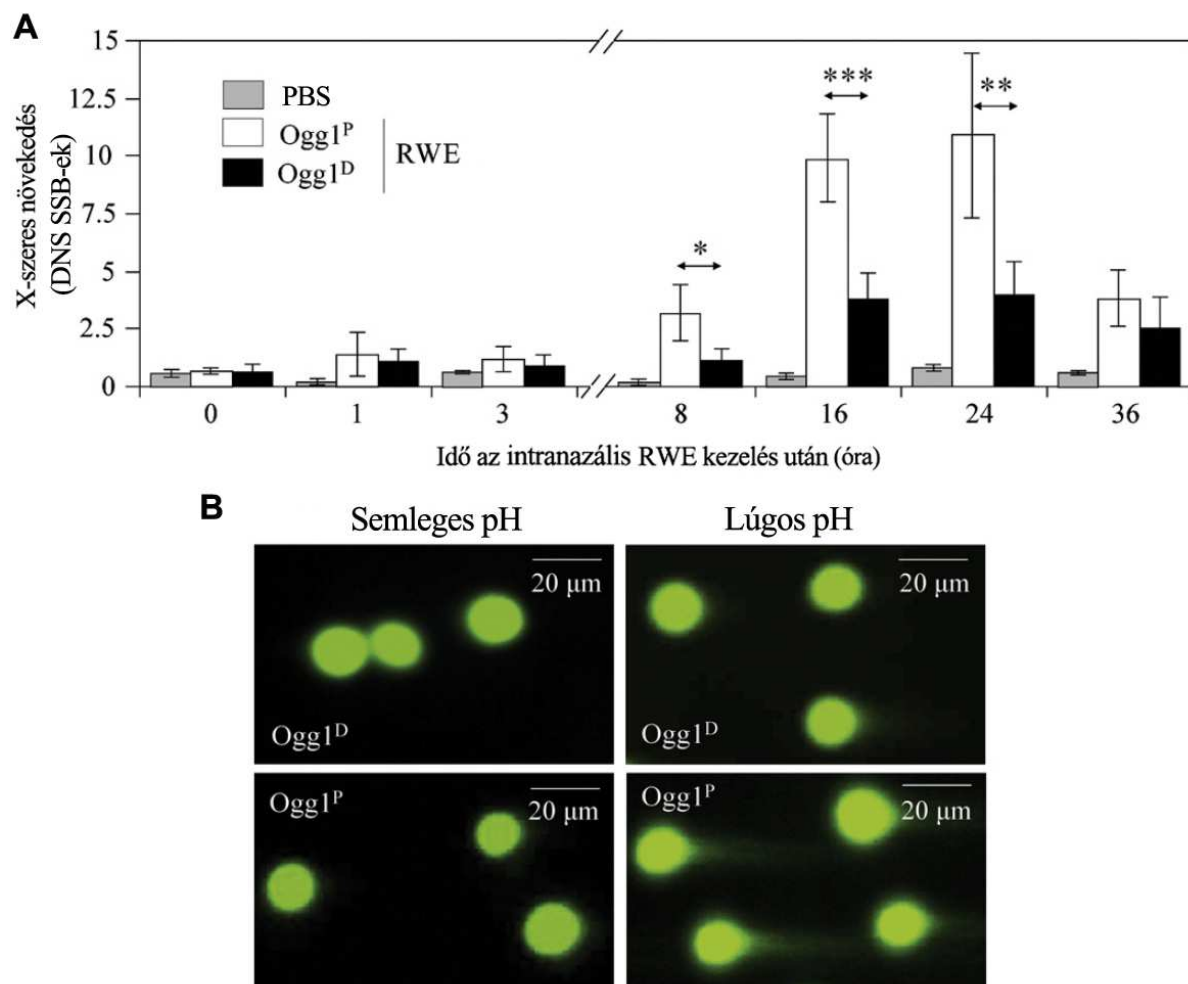
Ebben a tanulmányban azt vizsgáltuk, hogy a 8-oxoG akkumulációja és javítása a légúti hámsejtek DNS-ében, milyen szerepet játszik az allergiás válaszokban. Ehhez, siRNS technika felhasználásával gátoltuk az Ogg1 kifejeződését RWE-szenzitizált egerek (Ogg1 hiányos /deficient/ egerek: Ogg1^D egerek) légúti hámjában mielőtt intranazális RWE kezeléssel kiváltottuk volna az allergiás gyulladást a tüdőben. Ezeknek az állatoknak az allergiás válaszreakcióit olyan RWE-szenzitizált egerekével hasonlítottuk össze, amelyek kontroll siRNS kezelést kaptak (Ogg1-gyet normál mértékben kifejező /proficient/ egerek: Ogg1^P egerek). Szenzitizált Ogg1^P és Ogg1^D egereket kezeltünk PBS, vagy RWE oldattal, majd egyedi sejtes DNS gélelektroforézist (Comet esszé) kombinálva a DNS OGG1 általi emésztésével, meghatároztuk a 8-oxoG szinteket a légúti nyálkahártyáról leválasztott epitél sejtekben [272-274] (**43. A ábra**). Az Ogg1^P egerek légúti hámsejtjeiben a RWE-kezelés fél óra után $4,1 \pm 1,1$ -szeres, 1 óra után pedig $6,2 \pm 1,9$ -szeres növekedést indukált a 8-oxoG szintjében, a kezelés előtti szinthez képes. Három órával a kezelés után az Ogg1^P egerekben a 8-oxoG szint szignifikánsan lecsökkent (**43. B ábra**) az Ogg1 normál expressziójának megfelelően (**43. C ábra**), ami az oxidált guanin hatékony javítását jelezte. Az időbeli változások nyomon követése során kiderült, hogy 8 h és 36 h között a RWE kezelés után, a 8-oxoG szint növekedésében egy második fázis is kimutatható (**43. B ábra**). Ez a jelenség egybeesik a RWE kezelés hatására bekövetkező neutrofil granulocita beáramlás kinetikájával [275], illetve azzal hogy az aktivált neutrofilek ROS termelésére képesek [276]. Az Ogg1^D egerek légúti hámsejtjeiben az Ogg1 expressziója $83 \pm 9,1\%$ -kal csökkent RNS szinten (**43. C ábra**). Ezekben az egerekben az Ogg1 csökkent kifejeződésének megfelelően (**43. C ábra**), folyamatosan növekedett a 8-oxoG szintje a légúti hámsejtek DNS-ében (**43. B ábra**). Annak bizonyítására, hogy az Ogg1^D egerek légúti hámsejtjeinek DNS-ében a megnövekedett 8-oxoG szint a redukált Ogg1 kifejeződésnek tulajdonítható, és nem a légutak redox-kapacitásában bekövetkezett változásnak, meghatároztuk a GSH:GSSG arányát a BALF mintákban. A szenzitizált egerek légútjaiba juttatott Ogg1-specifikus-, vagy kontroll siRNS-nek nem volt hatása a GSH:GSSG arányra a BALF mintákban (**43. D ábra**). Az Ogg1^P és az Ogg1^D egerek között az intranazális RWE kezelést követően sem figyeltünk meg különbséget a GSH:GSSG arányban (**43. D ábra**). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a megnövekedett 8-oxoG szint a légúti hámsejtek DNS-ében az intranazális RWE kezelést követően, valóban az Ogg1 csökkent kifejeződésének tulajdonítható, nem pedig a légutak megváltozott redox-kapacitásának.



43. ábra. A 8-oxoG szintek változása a légúti hámsejtek DNS-ében RWE-kezelés után
 Szenzitizált Ogg1^P és Ogg1^D egereket kezeltünk RWE-tal, és majd különböző időpontokban meghatároztuk a 8-oxoG szinteket a légúti nyálkahártyáról leválasztott hámsejtekben. (A) A Comet esszé reprezentatív képei a DNS rekombináns OGG1-gyel történő emésztésével, illetve anélkül ($n = 200$ sejt). (B) 8-oxoG szintek kvantifikálása Ogg1^P ($n = 7$) és Ogg1^D ($n = 6$) egerek légúti hámsejtjeinek DNS-éből Comet esszével ($n = 200$ sejt analízise Comet esszével minden időpontban). (C) Az Ogg1 mRNA szintek a légúti epitélisejtekben 48 órával a kontroll, vagy Ogg1-specifikus siRNS tüdőbe juttatása után ($n = 5-11$). (D) A GSH:GSSG arányok $\pm$ SEM a bronchoalveoláris mosófolyadékban (BALF, $n = 7-9$). Ogg1^P egerek: a légúti epitéliumban az Ogg1-et normál szinten kifejező egerek; Ogg1^D egerek: a légúti epitéliumban az Ogg1-et csökkent mértékben kifejező egerek; OGG1, humán 8-oxoguanin DNS glikoziláz 1 fehérje; RWE, parlagfű pollen kivonat. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Oxidatív stressz során a DNS bázisok mellett a nukleinsav cukorváza is károsodhat, ami SSB, illetve DSB kialakulásához vezethet. A RWE kezelés utáni SSB-ek és DSB-ek szintjének meghatározásához, a légúti hámsejteket semleges és lúgos kémhatású körülmények között kivitelezett Comet esszével vizsgáltuk. A genom szuprafiziológiás

8-oxoG szintje (**43. B ábra**) ellenére, a RWE kezelés az első 3 órában nem változtatta meg lényegesen az SSB-ek előfordulását sem az Ogg1^P, sem az Ogg1^D egerek légúti hámsejtjeiben (**44. A ábra**).

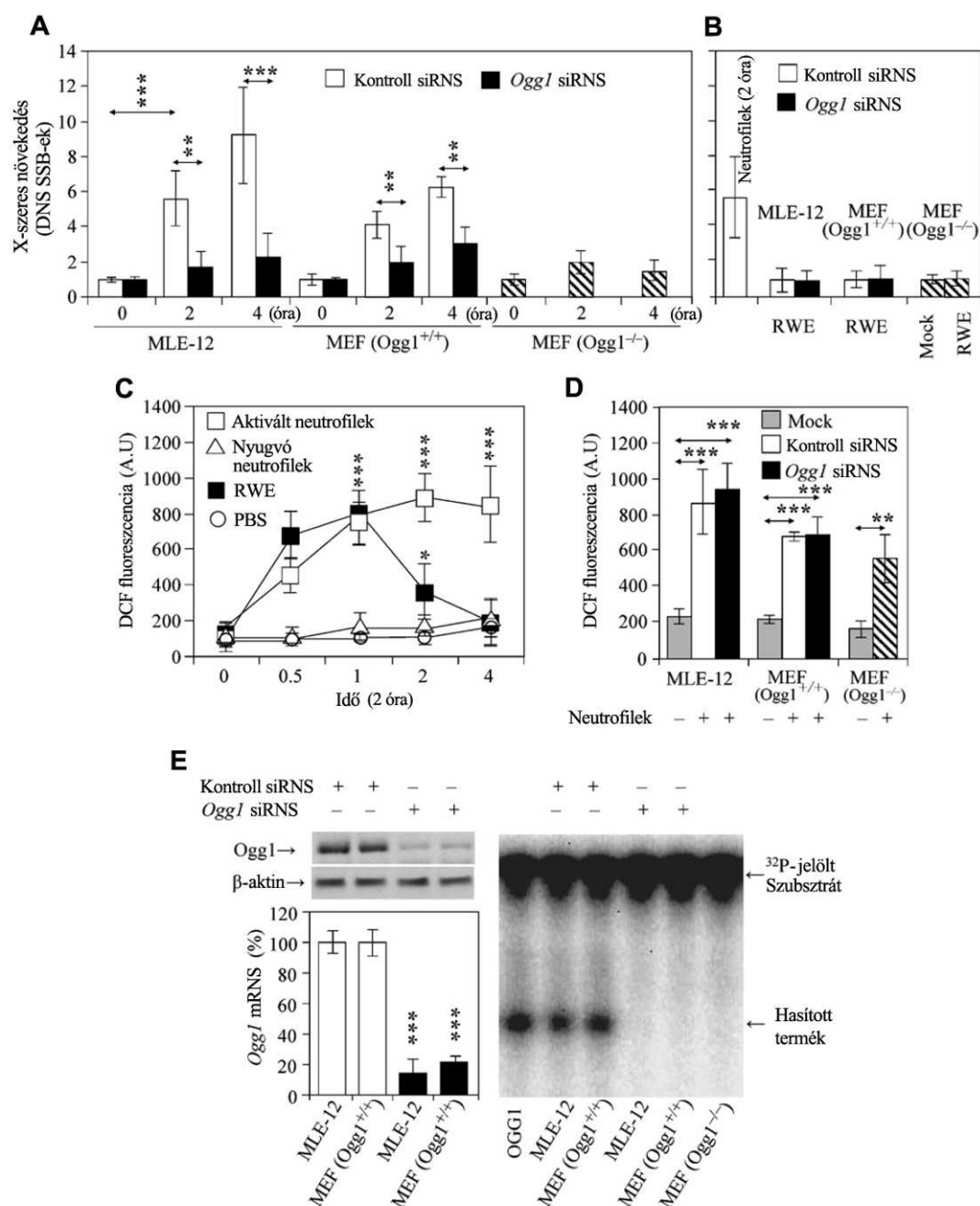


44. ábra. DNS-szál károsodások a RWE-kezelt, szenzitizált egerek légúti epitéliumában

Szenzitizált Ogg1^P és Ogg1^D egereket kezeltünk RWE-tal, majd a DNS-szál károsodásokat különböző időpontokban vizsgáltuk, Comet esszé segítségével, a légúti nyálkahártyáról leválasztott hámsejtjeiben. (A) Az SSB szintek változásai Ogg1^P és Ogg1^D egerek légúti epitéliumában RWE kezelés után. Minden kezelési típus és időpont esetén > 200 Comet csóvát elemeztünk. (B) Reprezentatív Comet csóvák semleges (baloldali képek) és lúgos (jobb oldali képek) kémhatású elektroforetikus feltételek között, amelyek a DNS kétszálú, és egyszálú töréseinek felelnek meg 16 órával a RWE kezelés után. Ogg1^P egerek: a légúti epitéliumban az Ogg1-et normál szinten kifejező egerek; Ogg1^D egerek: a légúti epitéliumban az Ogg1-et csökkent mértékben kifejező egerek; RWE: parlagfű pollen kivonat; SSB: egyszálú DNS törés. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

A neutrofil sejtek infiltrációja alatt (a RWE kezelés után 8, 16 és 24 órával), az SSB-ek előfordulása szignifikánsan nagyobb volt az Ogg1^P egerek légúti hámsejtjeiben az Ogg1^D egerekben megfigyeltéhez képest (**44. A és B ábra**, jobb panelek). A RWE kezelés utáni SSB-ek szintje közel azonos volt naív, és szenzitizált egerekben (az adatokat nem mutatom). A DSB-ek szintje egyik időpontban sem emelkedett a RWE kezelés után sem az Ogg1^P, sem az Ogg1^D egerek légúti hámsejtjeiben (**44. B ábra**, bal panelek; a mikroszkópos felvételek az intranazális RWE kezelés utáni 16 órás időpontot mutatják). A Neil1 és Neil2 kifejeződésének gátlása csak elhanyagolható mértékben változtatta meg az SSB-ek szintjét a légúti hámsejtekben (az adatokat nem mutatom). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a RWE kezelés utáni SSB-ek keletkezése független az adaptív immunválasztól, és úgy tűnik, hogy szoros összefüggésben van a neutrofileknek a légutakba történő beáramlása alatti Ogg1 kifejeződési szintekkel.

Ezeknek a megfigyeléseinknek a megerősítésére, együtt tenyésztettünk aktivált neutrofil sejteket Ogg1^P és Ogg1^D MLE-12 (egerekből származó, immortalizált, 2-es típusú tüdő hámsejtek), valamint MEF (egér embrionális fibroblaszt) sejtekkel (a neutrofilek és a MLE-12, vagy a MEF sejtek aránya 1:1 volt). Az aktivált neutrofilekkel történő 2 és 4 órás együtt tenyésztés szignifikáns növekedést okozott az SSB-ek szintjében, mind az Ogg1^P MLE-12, mind az Ogg1^P MEF sejtek esetében, a megfelelő Ogg1^D sejtípusokhoz viszonyítva (**45. A ábra**). A fenti eredmények további alátámasztásához Ogg1^{-/-} egerekből származó MEF sejteket alkalmaztunk [274, 277]. Az aktivált neutrofilekkel történő együtt tenyésztés szignifikánsan kevesebb SSB-t eredményezett az Ogg1^{-/-} MEF sejtekben, mint az Ogg1^{+/+} MEF sejtekben. Az aktiválatlan neutrofilek hozzáadása után nem változtak az SSB szintek sem az MLE-12, sem a MEF sejtekben (az adatokat nem mutatom). Másrészt a RWE kezelés nem befolyásolta lényegesen az SSB szinteket sem az Ogg1^P, sem az Ogg1^D sejtekben (**45. B ábra**). Az aktivált neutrofilekkel való tenyésztés, vagy a RWE kezelés nem változtatta meg az MLE-12 és a MEF sejtek életképességét, ahogy az az áramlási citometriával végzett Annexin V esszéből kiderült (az adatokat nem mutatom). Az Ogg1 mRNS-, és protein-szintjének, valamint az Ogg1 aktivitásának változását az Ogg1^{+/+} MEF és MLE-12 sejtekben a kontroll és a specifikus siRNA kezelések után a **45. E ábrán** tüntettük fel (az Ogg1^{-/-} egerekből származó MEF sejtek szolgáltak negatív kontrollként). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az Ogg1 aktivitás összefüggésben van a SSB-ek keletkezésével egerekben a neutrofil sejtek légutakba áramlása után, valamint *in vitro* körülmények között a sejtekben, aktivált neutrofilekkel való együtt tenyésztés során.



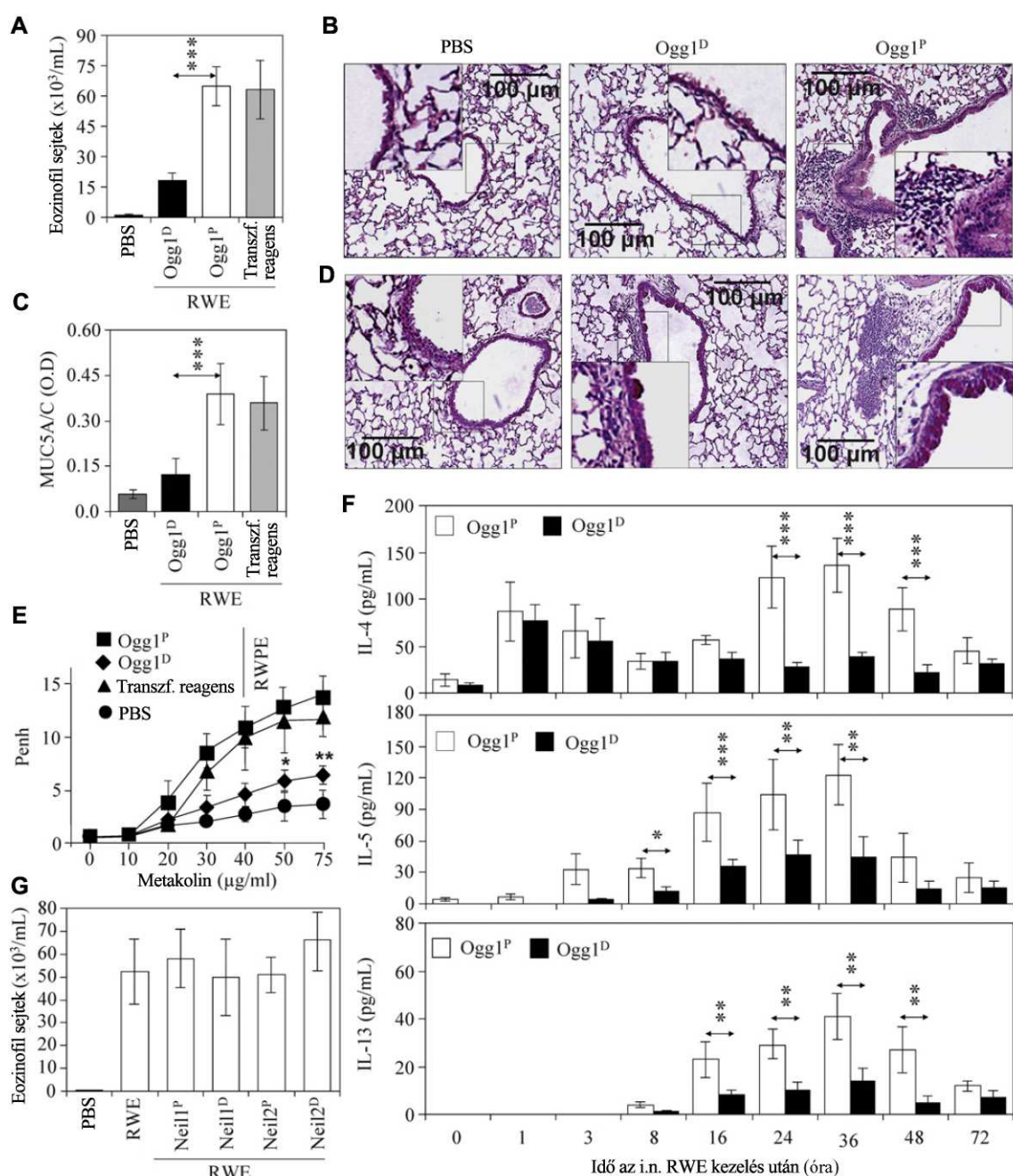
45. ábra. Az SSB-ek és az intracelluláris ROS szintje *Ogg1*^P és *Ogg1*^D sejtekben RWE kezelés vagy neutrofilekkel történő együtt tenyésztés után

(A) Az SSB szintek sejtenyészetekben. MLE-12 és MEF sejteket *Ogg1* siRNA-sel kezeltünk, majd együtt tenyésztettünk aktivált neutrofilekkel. Párhuzamos kísérletekben *Ogg1*^{-/-} MEF sejteket tenyésztettünk együtt aktivált neutrofilekkel. Az SSB szinteket lúgos kémhatáson végzett Comet esszével határoztuk meg. Minden kezelési típus és időpont esetén > 200 Comet csóvát elemeztünk. ***P* < 0,01, ****P* < 0,001. (B) A RWE kezelés nem indukált kimutatható növekedést a SSB szintekben. MLE-12 és *Ogg1*^{+/+} MEF sejteket transzfektáltunk kontroll, vagy *Ogg1* siRNA-ekkel, majd ezeket, valamint *Ogg1*^{-/-} MEF sejteket 2 órán át

kezeltük RWE-tal. Az SSB szinteket lúgos kémhatáson végzett Comet esszével határoztuk meg. A kontroll kísérletekben MLE-12 sejtekhez adtunk aktivált neutrofileket 2 órára. Mindegyik kezelésnél > 200 Comet csóvát értékeltünk. (C) Változások az MLE-12 sejtek ROS szintjében RWE kezelés, vagy aktivált neutrofilek hozzáadása után. Az intracelluláris ROS szintjét 2',7'-dihidro-diklorofluoreszcein diacetát (H₂DCF-DA) alkalmazásával határoztuk meg (n = 3-4). (D) Az Ogg1 hiánya nem okozott változást a neutrofilek által indukált ROS szintjében. Az Ogg1 kifejeződését siRNS-sel gátoltuk, Ogg1^{-/-} MEF sejteket használtunk kontrollként (n = 2-4). (E) Ogg1 fehérje (felső panel) és mRNS (alsó panel) szintek kontroll, vagy Ogg1 siRNS-sel transzfektált MLE-12 és Ogg1^{+/+} MEF sejtekben. Jobb panel: 8-oxoG kivágódása a ³²P-jelölt szubsztatrátból kontroll, vagy Ogg1 siRNS-sel transzfektált sejtek extraktumainak hozzáadása után. Ogg1: 8-oxoguanin DNS glikoziláz 1; RWE: parlagfű pollen kivonat; SSB: egyszálú DNS törés; MEF: egér embrionális fibroblaszt. **P < 0,01, ***P < 0,001.

A következőkben megnéztük az intracelluláris ROS szintjében és kinetikájában bekövetkező változásokat RWE kezelés, valamint aktivált neutrofilek hozzáadása után. Amíg az Ogg1^P MLE-12 sejtek együtt tenyésztése aktivált neutrofilekkel (1:1 arányban) folyamatos, addig a RWE kezelés csak átmeneti emelkedést okozott az intracelluláris ROS szintjében (45. C ábra). Az intracelluláris ROS-szint emelkedése 0,5 és 1 óránál hasonló volt mind a RWE, mind a neutrofilek hozzáadása után. Az aktivált neutrofilek azonban az intracelluláris ROS folyamatos emelkedését váltották ki (45. C ábra). A ROS szintjében bekövetkezett változások függetlenek voltak az Ogg1 expressziójától (45. D ábra). Ezek az adatok azt sugallják, hogy a SSB-ek keletkezéséért az Ogg1^P sejtekben a folyamatos oxidatív stressz lehet a felelős.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az Ogg1 kifejeződésének, a 8-oxoG javításának és az SSB-eknek a szerepét az allergiás immunválaszban, szenzitizált Ogg1^P és Ogg1^D egereket kezeltünk RWE-tal, majd meghatároztuk a légúti gyulladás mértékét. Meglepetésünkre, annak ellenére, hogy a 8-oxoG szint folyamatosan növekedett az Ogg1^D egerek légúti hámsejtjeinek DNS-ében (43. B ábra), lényegesen kevesebb eozinofil sejtet detektáltunk a BALF mintákban (46. A ábra) és a szubepitélialis területeken (46. B ábra, középső panel), alacsonyabb MUC5A/C szintet mértünk a BALF mintákban (46. C ábra), kisebb mértékű epitélisejt metapláziát figyeltünk meg (46. D ábra, középső panel) és kisebb Phen indexet tapasztaltunk (46. E ábra) az Ogg1^P egerek azonos paramétereirek képest. A megfigyelt jelenség Ogg1 specifikusnak tűnik, mivel a Neil1 glikoziláz [278] kifejeződésének gátlása nem befolyásolta az eozinofilek számát sem a BALF mintákban, sem a szubepitélialis régióban (46. G ábra).



46. ábra. Az Ogg1 kifejeződésének gátlása a légúti hámiban, csökkenti az allergiás gyulladás mértékét és a Th2 citokinek szintjét a szenzitizált egerek tüdejében RWE kezelés után

Szenzitizált Ogg1^P és Ogg1^D egereket kezeltünk PBS oldattal, vagy RWE-tal, majd a BALF mintákat és a tüdőből származó szövettani metszeteket analizáltuk. (A) Az eozinofil sejtek száma a BALF mintákban ($n = 9$). (B) A gyulladásos sejtek akkumulációja a peribronchiális területeken hematoxilinnal és eozinnal festett szöveti metszetekben ($n = 7-9$ egér/csoport). Nagyítás: 100x. (C) A MUC5A/C mennyisége a BALF mintákban ELISA módszerrel meghatározva ($n = 6-9$ egér/csoport). (D) A kehelysejt metapláziája a légúti hámiban PAS

festéssel megfestett szöveti metszetekben. Nagyítás: 100x. A képek 6-9 egér/csoportot reprezentálnak. (E) A légúti túlérzékenység mértékét 60 órával a kezelés után határoztuk meg ($n = 6-9$ egér/csoport) $*P < 0,05$, $**P < 0,01$. (F) Az IL-4 (felső panel), az IL-5 (középső panel), és az IL-13 (alsó panel) szintjeinek időbeli változásai a BALF mintákban RWE kezelés után ($n = 6-8$ egér/csoport). (G) A Neil1 és Neil2 DNS glikozilázok kifejeződésének gátlása siRNS-sel nem befolyásolja az eozinofil sejtek számát a BALF mintákban ($n = 5-7$ egér/csoport). Neil1^P: a légúti epitéliumban Neil1-et normál szinten kifejező egerek; Neil1^D: a légúti epitéliumban Neil1-t csökkent mértékben kifejező egerek; Neil2^P: légúti epitéliumban Neil2-t normál szinten kifejező egerek; Neil2^D: légúti epitéliumban Neil2-t csökkent mértékben kifejező egerek; Ogg1^P: a légúti epitéliumban az Ogg1-et normál szinten kifejező egerek; Ogg1^D: a légúti epitéliumban az Ogg1-et csökkent mértékben kifejező egerek; RWE: parlagfű pollen kivonat; BALF: bronchoalveoláris mosófolyadék. $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$.

Az allergiás légúti gyulladás kialakulásában fontos szerepet tulajdonítanak Th2 citokineknek (IL-4, IL-5 és IL-13), ugyanis ezek a mediátorok részt vesznek az eozinofil sejtek légúti akkumulációjának és aktiválódásának kiváltásában, a kehelysejtek metapláziájában és a nyáktermelés fokozódásában [279]. Mind az Ogg1^P, mind az Ogg1^D egerek BALF mintáiban a RWE kezelés azonnali (1 és 3 óra) IL-4-szint növekedést indukált (46. F ábra, felső panel), azonban a későbbi időpontokban (8, 16, 24, 36 és 48 óra) ez a szint csak az Ogg1^P egerek BALF mintáiban emelkedett tovább. Az IL-5 és IL-13 szintjei lényegesen alacsonyabbak voltak az Ogg1^D állatok BALF mintáiban, mint az Ogg1^P egerekében (46. F ábra, középső és alsó panelek). Ezek az adatok arra utalnak, hogy az Ogg1 által generált SSB-k összefüggésben vannak a Th2 citokinek termelődésével, és az allergiás légúti gyulladás fokozódásával.

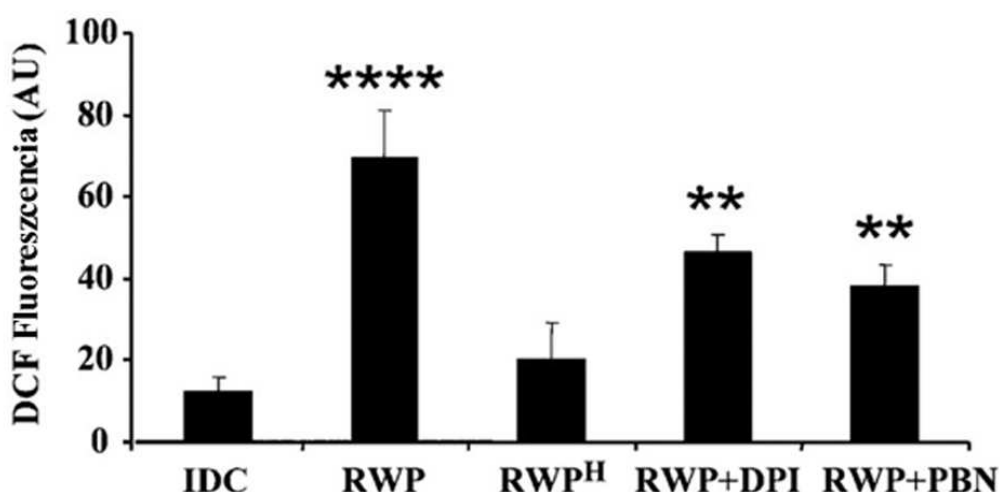
Gyulladásos körülmények között megnövekszik az oxidatíván károsodott DNS bázisok és DNS törések mennyisége, így ezeket akár a gyulladások biomarkereiként is lehet használni [280]. Ebben a vizsgálatban elsőként sikerült kimutatnunk, hogy a guanin oxidatív károsodásának a DNS-ben nincs közvetlen hatása a gyulladásra, viszont az Ogg1 által elindított 8-oxoG kivágás során a légúti hámban létrejövő SSB-ek szerepet játszanak az allergiás légúti gyulladás és a bronchiális hiperreaktivitást kialakulásában. A gyulladásos válaszok súlyosbodása az oxidatív DNS károsodás javítása alatt specifikus volt az Ogg1 működésére, mert más DNS glikozilázok /Neil1 és Neil2, amelyek nem a 8-oxoG, hanem más módosult purin és pirimidin bázisok felismerését és kivágását végzik [281]/ kifejeződésének gátlása nem befolyásolta szignifikánsan a RWE által kiváltott gyulladásos válaszokat a tüdőben. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy nem a 8-oxoG

felhalmozódása a genomban, hanem az Ogg1 által kezdeményezett kijavítása a 8-oxoG-nak súlyosbítja az allergiás gyulladást.

Az Ogg1 működése során kivágja a 8-oxoG-t a DNS-ből, és közben a glikoziláz / AP liáz aktivitása révén SSB-t hoz létre [282, 283]. Fiziológiás körülmények között az Ogg1 komplexet alkot más, a DNS hibák javításában résztvevő fehérjékkel, és együtt helyreállítják a DNS integritását [284, 285]. Úgy tűnik, hogy ez történik a RWE kezelés után közvetlenül az Ogg1^P egerekben, mivel a légúti hámban a 8-oxoG kijavítódik az SSB-ek számának jelentős növekedése nélkül. Felmerülhet a kérdés, hogy az aktivált neutrofilek beáramlását követően, miért növekszik meg az SSB-ek száma a légutakban. Az egyik lehetséges magyarázat, hogy elhúzódó oxidatív stressz során az Ogg1 glikoziláz és AP liáz aktivitása közötti összhang felborul, ami azt eredményezi, hogy nem tud megfelelő komplexeket kialakítani a többi DNS javító fehérjével, és ez vezet az SSB-ek halmozódásához a genomban [283, 286]. Egy másik elképzelés szerint, elhúzódó oxidatív stressz során az Ogg1 kisebb affinitással kötődik a DNS-hez a 8-oxoG kivágása után, és nem tudja megvédeni a keletkezett bázis-mentes részt a hasító enzimektől (pl. Nth1 és DNS topoizomerázok) [283, 287, 288]. Bár a pontos molekuláris mechanizmus még nem ismert, de úgy tűnik, hogy az Ogg1 működése eredményezi az SSB-ek számának átmeneti megemelkedését a légúti hámban a RWE kezelés által kiváltott neutrofilia során. Az SSB-ek mennyisége jelentősen megnövekedett az Ogg1^P állatokban, ezért feltételezhetjük, hogy az allergiás gyulladást a DNS károsodással asszociált szignálok súlyosbították. Ezzel összhangban, egy nemrég vizsgálatban kiderült, hogy DNS károsodás által kiváltott szignálok résztvesznek a Th2 válaszok kialakulásában, így az IgE és az IgG1 termelődésében is OVA szenzitizáció / immunizálás során [289]. Sőt, kiderült az is, hogy az atópiás egyének nazális hámsejtjeiben több DNS törés detektálható oxidatív környezeti behatást követően, mint a nem-atópiás egyének sejtjeiben [290]. Li és mtsai Ogg1^{-/-} egereket tanulmányozva azt figyelték meg, hogy szenzitizált állatok OVA kezelését követően csak enyhe légúti gyulladás alakult ki [291]. Megfigyelések alapján arra következtettek, hogy az Ogg1 kifejeződése oxidatív stresszt eredményez a légutakban OVA kezelést követően, ami a STAT6 és az NF-κB aktiváláshoz, valamint fokozott IL-4, IL-6, IL-10 és IL-17 termelődéshez vezet a vad típusú egerekben. A mi modellünkben az Ogg1 kifejeződésének gátlása nem változtatta meg a redox egyensúlyt (GSH: GSSG arányt) a kísérleti egerek légútjaiban. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az Ogg1 különböző mechanizmusokkal is modulálhatja a gyulladós folyamatokat, ezért működésének átmeneti gátlása a légutakban csökkentheti a gyulladások súlyosságát.

5.8. A pollen eredetű oxidatív stressz befolyásolja a veleszületett és a szerzett immunválaszokat is a dendritikus sejtek működésének megváltoztatásával

Az eddig bemutatott kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy milyen szerepe lehet a pollen NAD(P)H oxidázoknak az allergiás reakciók kiváltásában szenzitizált szervezetben. A következő vizsgálatokban azt próbáltuk kideríteni, hogy a pollen NAD(P)H oxidázok által indukált oxidatív stressz hozzájárulhat-e a DC-k aktiválódásához pollen expozíciót követően. Az első kísérletsorozatban az intakt pollenszemeknek a humán monocita eredetű DC-k működésére gyakorolt hatását vizsgáltuk. Először azt teszteltük, hogy a pollen expozíció megnöveli-e ezekben a DC-kben az intracelluláris ROS szintjét. Ehhez éretlen DC-eket feltöltöttünk $H_2DCF\text{-}DA$ -tal, majd RWP-et adtunk a sejt kultúrához. A pollenkezelés gyors, $5,9 \pm 2,1$ -szeres növekedést eredményezett az intracelluláris DCF fluoreszcenciában, ami megelőzhető volt a pollenszemek előzetes hőkezelésével (47. ábra).

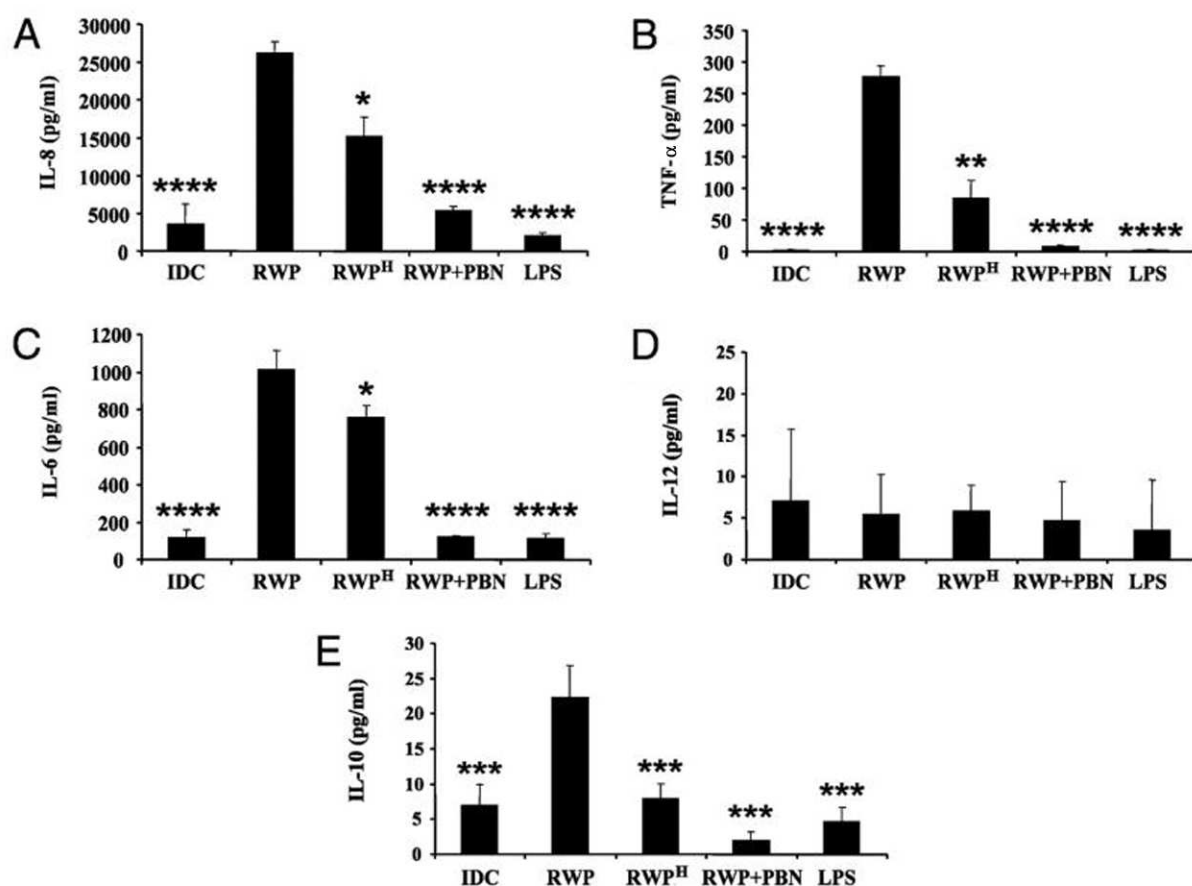


47. ábra. A RWP-kel történő kezelés megnöveli az intracelluláris ROS szintjét monocita eredetű DC-kben

A sejteket $H_2DCF\text{-}DA$ -tal töltöttük fel, majd a jelölések szerint kezeltük. A DCF fluoreszcencia változását fluorimetriával mértük. Az adatokat 4 független kísérlet átlaga $\pm$ SEM formában ábrázoltuk. $**P < 0,01$; $****P < 0,0001$ vs IDC kontroll. AU: tetszőleges egység; IDC: kezeletlen, éretlen DC-k; RWP: parlagfű pollenszemekkel kezelt DC-k; RWP^H: hőinaktivált /72°C, 30 perc/ parlagfű pollenszemekkel kezelt DC-k; DPI: difenilén-jodónium; PBN: N-terc-butyl- α -fenil-nitron.

Ha a RWP-et előkezeltük DPI-mal, egy NAD(P)H oxidáz inhibitorral, akkor a RWP expozíció szintén szignifikánsan kisebb intracelluláris ROS-szint emelkedést eredményezett **(47. ábra)**. Annak további megerősítésére, hogy a pollenszemek által termelt reaktív gyökök a felelősek a megnövekedett DCF fluoreszcenciáért a DC-kben, N-terc-butil- α -fenil-nitront (PBN) alkalmaztunk, ami a szabadgyökök azonosításában használatos, spin-csapdaként működő vegyület [292]. A PBN molekulák szabadgyök semlegesítő képessége hasonló aktivitással ruházta fel őket, mint amilyenekkel az antioxidánsok rendelkeznek [293]. A PBN jelenléte a sejtenyészeti médiumában szignifikánsan csökkentette a RWP által indukált oxidatív stresszt a DC-kben **(47. ábra)**. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a pollenkezelés képes oxidatív stresszt indukálni a DC-kben, ami meggátolható antioxidánsokkal, valamint a pollen NAD(P)H oxidázok fizikai vagy kémiai inaktivációjával.

A reaktív oxigéngyökök közvetlenül [294], vagy oxidált glikoproteineken keresztül képesek a veleszületett immunválaszokban kulcsfontosságú citokinek képződését kiváltani [295], ezért megvizsgáltuk a RWP kezelés hatását a DC-k kemokin és citokin termelésére. Egy nappal a pollenkezelés után az IL-8 ($7,4 \pm 1,3$ -szeres növekedés), a TNF- α ($150 \pm 60,1$ -szeres növekedés), és az IL-6 ($9,3 \pm 2,6$ -szeres növekedés) szintje szignifikánsan magasabb volt a pollenkezelt DC-k felülszójában, mint a kezeltlen sejtekében **(48. A-C ábra)**. Ezzel szemben, a pollenszemek egyáltalán nem indukálták a DC-k IL-1 β szekrécióját az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között. Annak kiderítésére, hogy vajon a kemokin és citokin termelés a RWP oxidatív hatásának következménye-e, a sejtek pollenkezelését elvégeztük PBN hozzáadásával is. Az antioxidáns jelenlétében a DC-k IL-8, TNF- α és IL-6 termelése az alapszintnek megfelelő volt a pollenkezelés után **(48. A-C ábra)**. A PBN-nal történő kezelés önmagában nem befolyásolta a DC-k kemokin és citokin szekrécióját (az adatokat nem mutatom). Meglepő módon, a pollenszemek előzetes hőkezelése, ami megszünteti a pollen NAD(P)H oxidázok aktivitását, nem eliminálta teljesen a RWP citokin-indukáló kapacitását **(48. A-C ábra)**. Korábbi tanulmányok szerint, a bakteriális LPS is képes oxidatív stresszt indukálni monocita eredetű DC-kben, és kiváltja többféle citokin szekrécióját is [296]. Annak a lehetőségnek a kizárására, hogy a pollen-indukálta DC aktiváció a RWP LPS szennyeződéséből ered, meghatároztuk a pollen mintáink LPS tartalmát. A pollen minták elemzését *Limulus* amoebocita lizátum teszt felhasználásával végeztük el. A teszt 16 pg/ml koncentrációjú LPS jelenlétét mutatta ki, ezért a további kísérleteinkben ezzel megegyező mennyiségű, *Escherichia coli*-ból származó LPS-t használtunk kontrollként. Az éretlen DC-k ilyen kis mennyiségű LPS-dal történő kezelése nem indukált IL-8, TNF- α vagy IL-6 szekréciót **(48. A-C ábra)**.

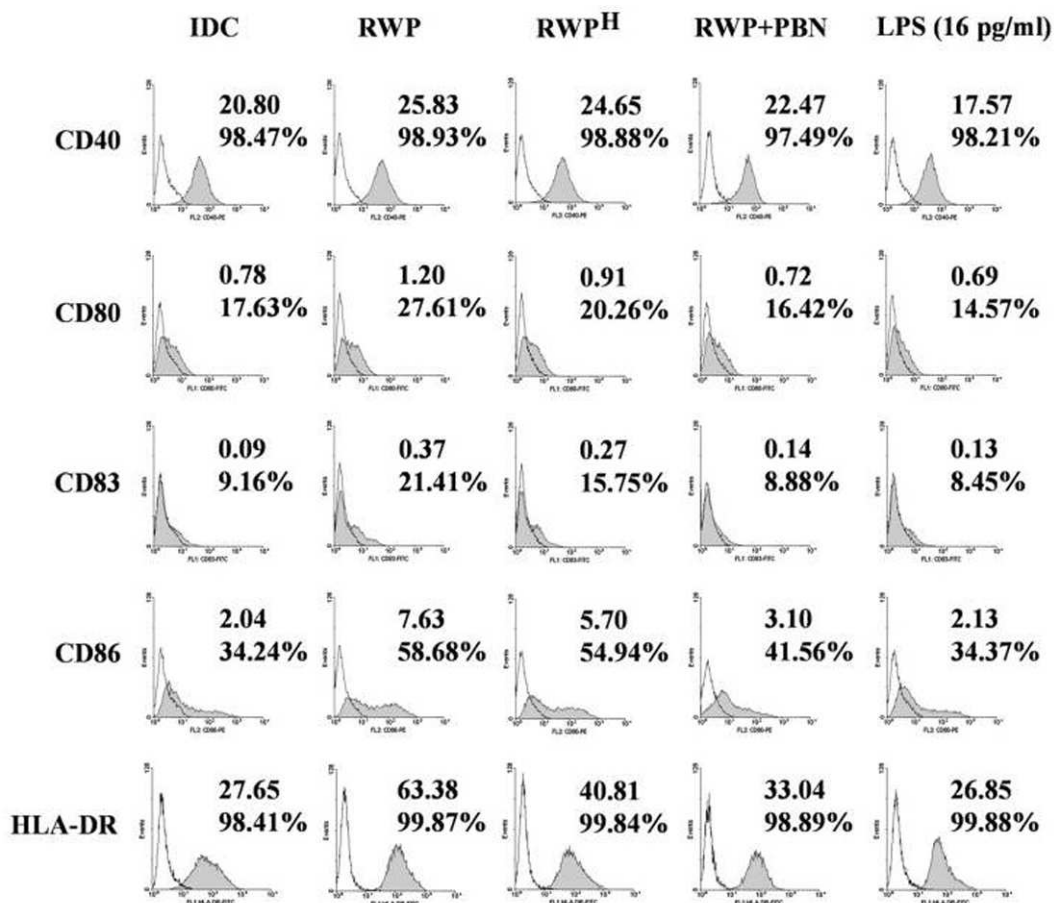


48. ábra. A pollenkezelés által indukált oxidatív stressz hatása a DC-k kemokin és citokin termelésére

Az IL-8 (A), a TNF- α (B), az IL-6 (C), az IL-12(p70) (D), és az IL-10 (E) szinteket a DC-k felülszójában 24 órával a pollenkezelés után határoztuk meg ELISA módszerrel. Meghatároztuk a parlagfű pollen minták endotoxin szennyezettségét is, és azzal ekvivalens *E.coli* LPS-t (16 pg/ml) használtunk a kísérletben kontrollként. Az adatokat 4-5 független kísérlet átlaga $\pm$ SEM formában ábrázoltuk. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ vs pollenkezelt DC-k. IDC: kezeletlen, éretlen DC-k; RWP: parlagfű pollenszemekkel kezelt DC-k; RWP^H: hőinaktivált /72°C, 30 perc/ parlagfű pollenszemekkel kezelt DC-k; PBN: N-terc-butil- α -fenil-nitron; LPS: lipopoliszachariddal kezelt DC-k.

Az aktiválódott DC-k fenotípusos és funkcionális változásai a környéki nyirokcsomókba történő antigén szállítás során, képessé teszi őket a T-sejtek aktiválására és az adaptív immunválasz elindítására. Annak vizsgálatára, hogy a pollenszemek által indukált oxidatív stressz hozzájárul-e a DC-k fenotípusos változásaihoz, a monocita eredetű, éretlen DC-keket RWP-vel inkubáltuk 24 órán keresztül PBN jelenlétében vagy hiányában, majd a kostimulációs molekulák (CD40, CD80 és CD86), a CD83 (specifikus érési marker) és az

antigén-prezentáló HLA-DR kifejeződését áramlási citometriával analizáltuk. A kontroll kísérletekben az éretlen DC-ket 16 pg/ml LPS-dal kezeltük. Az éretlen DC-k pollenkezelése csak kismértékben növelte a CD40 expresszióját (a relatív fluoreszcencia intenzitás [RFI] 20,80-ról 25,83-ra nőtt), míg jelentősen megnövelte a CD80 (RFI 0,78-ról 1,20-ra nőtt), a CD86 (RFI 2,04-ról 7,63-ra nőtt), a CD83 (RFI 0,09-ről 0,37-ra, valamint a gyakoriság 9,16%-ról 21,41%-ra nőtt), és a HLA-DR (RFI 27,65-ről 63,38-ra nőtt) kifejeződését (**8.3. ábra**).

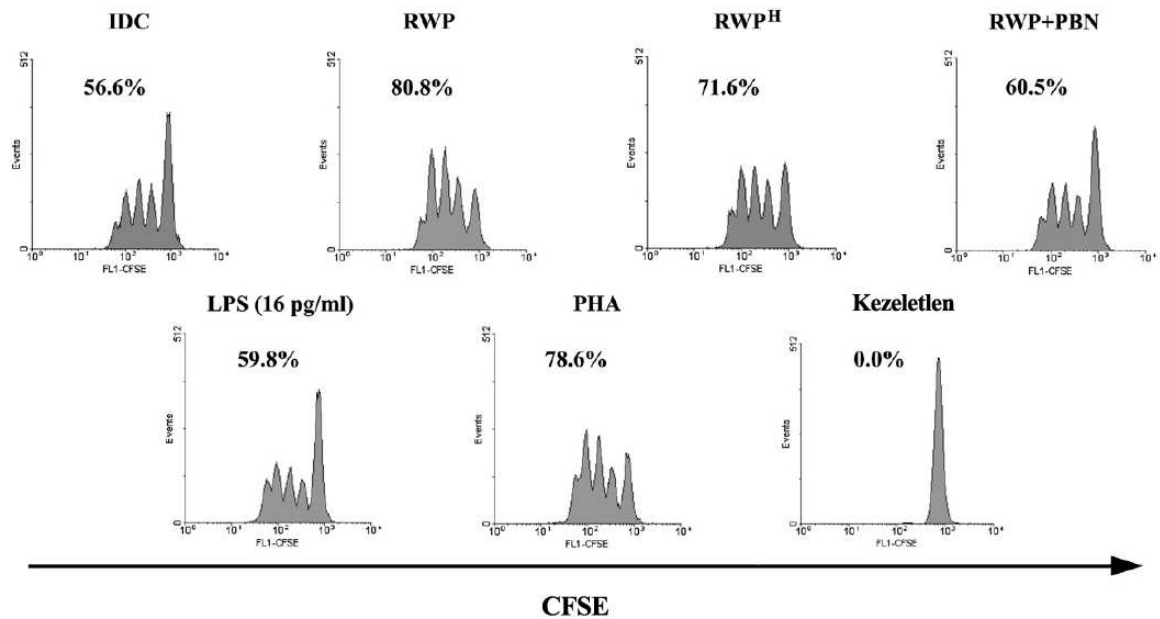


49. ábra. A pollenkezelés által indukált oxidatív stressz hozzájárul a DC-k fenotípusos éréséhez

Éretlen DC-ket kezeltünk RWP-kel 24 órán át, majd a HLA-DR, a kostimulációs molekulák és az érési markerek kifejeződését áramlási citometriával vizsgáltuk. Az üres hisztogramok az izotípus kontrollt jelzik. A számok az RFI (felső) és a pozitív sejtek (alsó) százalékát jelölik. Az eredmények 6 független kísérletet reprezentálnak. IDC: kezeletlen, éretlen DC-k; RWP: parlagfű pollenszemekkel kezelt DC-k; RWP^H: hőinaktivált /72°C, 30 perc/ parlagfű pollenszemekkel kezelt DC-k; PBN: N-terc-butyl- α -fenil-nitron; LPS: lipopoliszachariddal kezelt DC-k.

A pollenszemek előzetes hőkezelése csökkentette ugyan, de nem szüntette meg teljesen a RWP-ek DC-aktiváló hatását (**49. ábra**). A PBN jelenlétében kisebbek voltak a pollenkezelés által kiváltott változások a vizsgált sejtfelszíni molekulák kifejeződésében (**49. ábra**), míg a PBN kezelés önmagában nem változtatta meg a DC-k fenotípusát (az adatokat nem mutatom). Az alacsony koncentrációjú LPS sem volt hatásos a kostimulációs és érési markerek kifejeződésének indukálásában, ezért a DC-k éretlen állapotban maradtak (**49. ábra**). Ezekből az eredményekből az derül ki, hogy a pollenkezelés által indukált oxidatív stressz képes a gyulladásos mediátorok fokozott termelésének, valamint a DC-k fenotípusos aktiválásának és érési folyamatainak beindítására. Megfigyeléseink azt mutatják, hogy a pollenszemek NAD(P)H oxidázain kívül, más pollen komponensek is hozzájárulnak a megnövekedett ROS szintjéhez a DC-kben. Korábbi vizsgálatok eredményei szerint komplex glükán szerkezetek, amelyek $\alpha(1-3)$ -fukozilált központi maggal rendelkeznek, vagy membrán lipidperoxidációs termékek közvetlenül, vagy közvetve aktiválhatják a TLR4 szignalizációs útvonalat [297-299]. A RWP-ek tartalmaznak ilyen komplex glükán szerkezeteket, és a pollen membránok is érzékenyek az enzimatis, vagy a szabad gyökök általi peroxidációra [300, 301], ezért feltételezzük, hogy ezek a pollen komponensek TLR4-közvetített mechanizmussal szerepet játszhatnak az oxidatív stressz kialakulásában a DC-kben pollen expozíciót követően. A TLR4-közvetített jelátviteli folyamatok jelentőségét a pollen által kiváltott allergiás reakciókban megerősíti, hogy TLR4 deficiens, vagy MyD88 génkiütött egerekben a parlagfű pollenszemek csak enyhe klinikai tünetekkel járó kötőhártya-gyulladást okoznak [302].

A DC-ket tekintik a leghatékonyabb hivatásos APC-nek, ezért a következőkben megvizsgáltuk a pollen-aktivált DC-k alloaktivációs képességét. A CFSE-rel jelölt naív, allogén CD4⁺ T-limfociták válaszkészségét a pollenkezelt DC-k által bemutatott antigénekre áramlási citometriával vizsgáltuk 4 nappal az együtt tenyésztés kezdete után. A pollenkezelt DC-k hatékonyan indukálták a T-sejtek proliferációját. A pollen-aktiválta DC-ket tartalmazó ko-kultúrák magasabb arányban tartalmaztak osztódó T-sejteket, mint az éretlen DC-ket tartalmazók (80,8% vs 56,6%) (**50. ábra**). A DC-k csökkent alloaktivációs kapacitást mutattak, ha hőinaktivált pollenszemekkel történt a kezelésük (71,6% osztódó T-sejt), vagy PBN jelenlétében (60,5% osztódó T-sejt) (**50. ábra**). A PBN kezelés önmagában nem változtatta meg a DC-knek az allogén T-sejteket aktiváló képességét (az adatokat nem mutatom). A DC-k LPS-dal (16 pg/ml) történő kezelése az allogén T-sejteknek csak kisfokú osztódását indukálta (59,8%) (**50. ábra**). Pozitív kontrollként, fitohemagglutinin (PHA), egy poliklonális T-sejt mitogénnel, kezeltük a naív, CD4⁺ T-sejteket. Az alkalmazott kísérleti rendszerben a sejtek 78,6%-a osztódott a PHA-kezelés hatására. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a pollenkezelt DC-k alloaktivációs képessége részben a pollen-indukálta oxidatív stressztől függ.

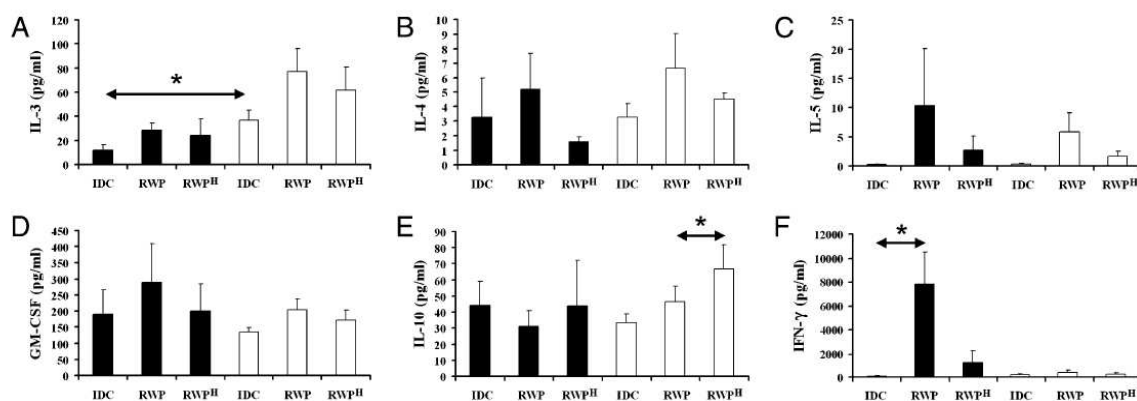


50. ábra. A pollenkezelés által kiváltott oxidatív stressz fokozza a DC-knek az allogén T-sejt aktiváló képességét

A pollenkezelt DC-ket együtt tenyésztettük CFSE-rel feltöltött allogén, naív T-sejtekkel 4 napig, majd a fluoreszcencia intenzitásokat áramlási citométerrel mértük. A számok az osztódó T-sejtek arányát jelölik. Az eredmények 4 független kísérletet reprezentálnak. IDC: kezeletlen, éretlen DC-k; RWP: parlagfű pollenszemekkel kezelt DC-k; RWP^H: hőinaktivált /72°C, 30 perc/ parlagfű pollenszemekkel kezelt DC-k; PBN: N-terc-butyl- α -fenil-nitron; LPS: lipopoliszachariddal kezelt DC-k, PHA: fitohemagglutininnal kezelt T-sejtek.

A T-sejt polarizációt a kölcsönhatásba kerülő DC-k és T-sejtek citokin környezete nagyban befolyásolja. A következőkben megvizsgáltuk a DC-k IL-12 és IL-10 termelését 24 órával a pollenkezelés után, mivel ezek a citokinek játszanak kulcsszerepet a T-sejt polarizációban. Az éretlen DC-k nagyon kis mennyiségű IL-12(p70)-t szekretáltak, amit a pollenszemekkel történő kezelés nem befolyásolt lényegesen (**48. D ábra**). A pollennel kezelt DC-k $22 \pm 4,5$ pg/ml IL-10-et termeltek, ami lényegesen magasabb volt, mint a kezeletlen DC-k által kiválasztott $6,9 \pm 3,1$ pg/ml mennyiség (**48. E ábra**). A hőinaktivált pollennel történő kezelés nem növelte a DC-k IL-10 termelését. A PBN jelenléte a pollenkezelés során szignifikánsan csökkentette a DC-k IL-10 termelését (**48. E ábra**). A kontroll kísérletekben, a LPS (16 pg/ml) nem befolyásolta a DC-k IL-10 szekrécióját (**48. E ábra**). Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a pollen NAD(P)H oxidázok szerepét a DC-k T-sejt-polarizáló képességében, meghatároztuk parlagfű allergiások és nem allergiások perifériális véréből izolált naív T-sejtek citokin szekréciós profilját, miután ezeket a sejteket pollenkezelt, autológ DC-kkel tenyésztettük együtt. A T-sejtek kiválasztása és

újraktíválása után citometriás mikrogöngy esszé alkalmazásával határoztuk meg az IL-3, az IL-4, az IL-5, az IL-7, az IL-10 és a GM-CSF szinteket a T-sejt kultúrák felülúszójában. Az IFN- γ koncentrációját ELISA módszerrel mértük meg a sejtenyészetek felülúszójából. Az adott kísérleti beállítások mellett nem tudtuk a T-sejtek IL-7 szekrécióját kimutatni. A parlagfű allergiás egyénekből származó T-sejtek szignifikánsan több IL-3-at szekretáltak autológ DC-kkel való aktiváció után, mint a nem allergiás egyénekből származók ($37 \pm 7,8$ vs $12,3 \pm 4,1$ pg/ml) (**51. A ábra**). A pollenkezelt autológ DC-kkel aktivált T-sejtek több Th2 citokint (IL-4 és IL-5) termeltek, mint az éretlen DC-kkel aktiváltak (**51. B és C ábra**). A GM-CSF a T-sejtek Th1/Th2 elköteleződéstől független differenciálódási faktora, szintén magasabb volt a pollenkezelt, autológ DC-kkel aktivált T-sejtek felülúszójában, mint a kezeletlen DC-kkel aktiváltakéban (**51. D ábra**). Nem találtunk azonban szignifikáns különbséget a különböző eredetű T-sejtek által szekretált IL-4, IL-5 vagy GM-CSF szintjében.

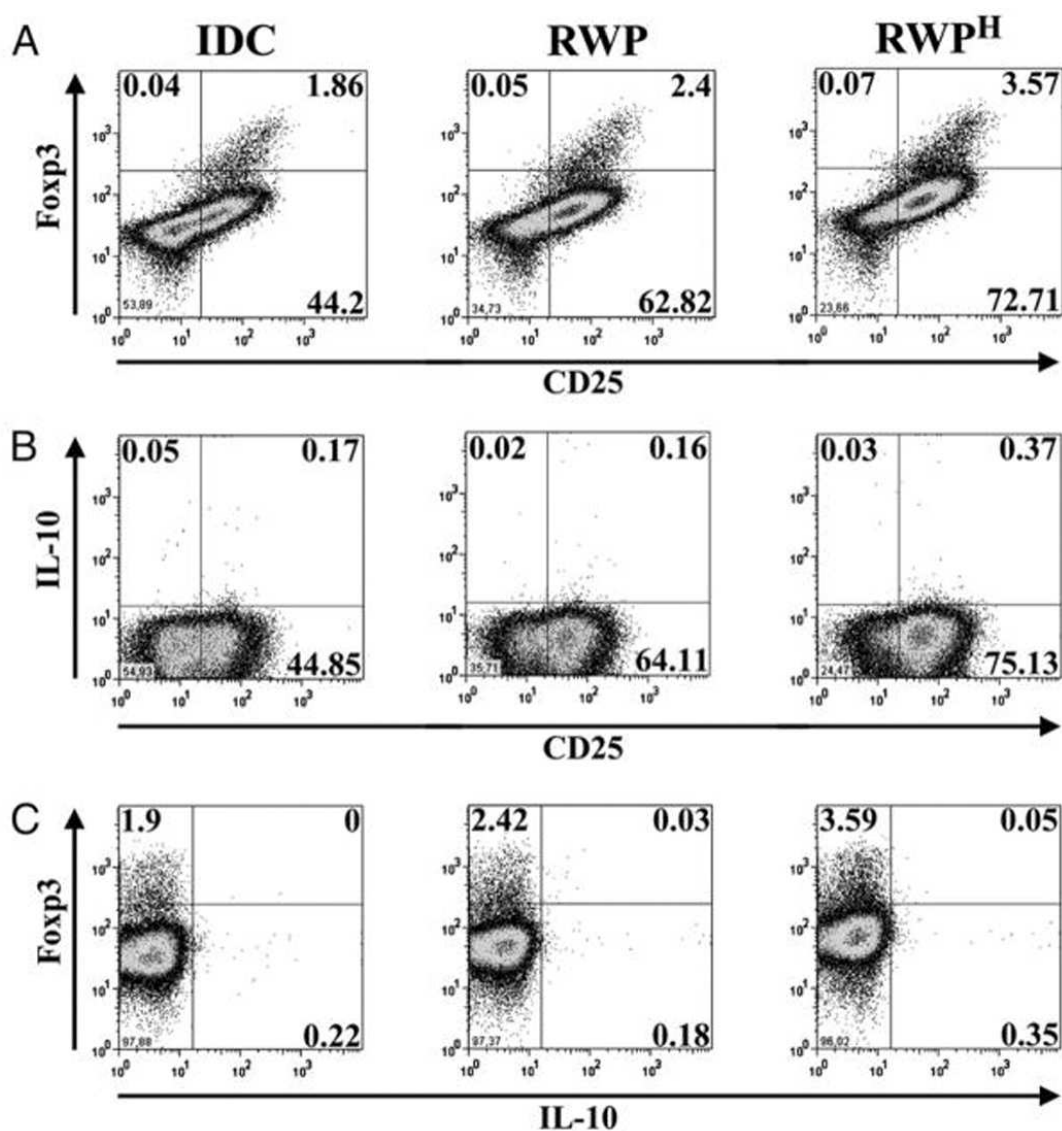


51. ábra. A pollen-indukált oxidatív stressz befolyásolja a DC-k T-sejt-polarizáló képességét

A pollenkezelt DC-kkel aktivált T-limfociták citokin szekréciós profiljának elemzéséhez a monocitákat és a naív CD4⁺ T-sejteket 3 parlagfű allergiás (□) és 3 nem-allergiás (■) donor buffy coat-jából izoláltuk. A pollenkezelt DC-ket együtt tenyésztettük az autológ, naív CD4⁺ T-sejtekkel 4 napig, majd a T-sejteket szeparáltuk és 24 órán át újraktívtuk. A T-sejtek felülúszóit összegyűjtöttük, majd citometriás mikrogöngy esszé felhasználásával meghatároztuk belőlük az IL-3 (A), az IL-4 (B), az IL-5 (C), a GM-CSF (D), és az IL-10 (E) szinteket, amíg az IFN- γ (F) koncentrációját ELISA módszerrel mértük meg. Az adatokat 3 független kísérlet átlaga $\pm$ SEM formában ábrázoltuk. * $P < 0,05$. IDC: kezeletlen, éretlen DC-k; RWP: parlagfű pollenszemekkel kezelt DC-k; RWP^H: hőinaktivált /72°C, 30 perc/ parlagfű pollenszemekkel kezelt DC-k.

A hőinaktivált pollenszemekkel kezelt autológ DC-k nem indukálták hatékonyan a T-sejtek citokin szekrécióját. Az egyetlen kivétel ez alól az IL-10 volt, amit a parlagfű allergiás egyénekből izolált T-sejtek szignifikánsan nagyobb mennyiségben termeltek, ha nem intakt pollennel kezelt, hanem hőinaktivált pollennel kezelt DC-kkel tenyésztettük együtt ($66,9 \pm 15$ vs $46,6 \pm 9,6$ pg/ml) (**51. E ábra**). Ugyanez az aktiválási mód nem indukálta több IL-10 szekrécióját a nem-allergiás donorokból izolált T-sejtekből (**51. E ábra**). A pollenkezelt, autológ DC-kkel aktivált, nem-allergiás egyénekből származó T-sejtek 19,5-szer több IFN- γ -t termeltek, mint az allergiás donorokból származók (7771 ± 2681 vs 399 ± 149 pg/ml) (**51. F ábra**). Korábbi megfigyelések szerint, az antioxidánsok a DC-k endogén oxidatív útvonalainak gátlásával a regulátor T-sejtek kialakulását támogatják [303], ezért ezekben a kísérletekben nem alkalmaztuk a PBN-t, vagy más antioxidánst kontrollként.

A parlagfű allergiás donorokból származó, IL-10 termelő T-sejt alpopuláció(k) azonosítása céljából, először megvizsgáltuk a CD25⁺Foxp3⁺ T-sejtek jelenlétét a sejt kultúrákban autológ DC-kkel történő aktiváció előtt és után. A CD4-re, CD25-re és intracelluláris Foxp3-ra jelölt sejtek áramlási citometriával történő azonosítása azt mutatta, hogy a naív T-sejtek között $0,85 \pm 0,03\%$ -nyi CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulátor T-sejt volt kontaminációként (az adatokat nem mutatom). Az éretlen DC-kkel történő aktiváció megnövelte ezt az arányt $2,38 \pm 0,42\%$ -ra. A pollenkezelt DC-kkel történt stimuláció $2,73 \pm 0,27\%$ -os arányt eredményezett ($n=3$; $P < 0,001$ vs éretlen DC-kkel aktivált sejtek), amíg a hőinaktivált pollennel kezelt DC-k általi aktiváció esetén a CD25⁺Foxp3⁺ T-sejtek aránya $3,61 \pm 0,03\%$ volt ($n=3$; $P < 0,001$ vs pollenkezelt DC-kkel aktivált sejtek) (**52. A ábra**). A CD25-re és intracelluláris IL-10-re történő párhuzamos jelölés azonosított egy kisméretű ($0,28 \pm 0,04\%$), IL-10-termelő sejt populációt (**52. B és C ábra**). A pollenkezelt DC-kkel történő aktiválás nem változtatta meg az IL-10⁺ T-sejtek arányát a kezeletlenekhez képest ($0,27 \pm 0,07\%$; $n=3$; $P = 0,417$). Azonban a hőinaktivált pollennel kezelt DC-kkel történő aktiválás 2,3-szorosára növelte az IL-10⁺ T-sejtek arányát ($0,625 \pm 0,18\%$; $n=3$; $p < 0,001$ vs pollenkezelt DC-kkel aktivált sejtek) (**52. B és C ábra**). A citometriás eredmények elemzéséből az derült ki, hogy a CD25⁺IL-10⁺ T-sejtek a fő forrásai az IL-10-nek a DC-k által aktivált T-limfocita populációban (**52. B és C ábra**). Ezek az adatok azt sugallják, hogy a pollenkezelt DC-k képesek a naív T-sejtek differenciációját kiváltani vegyes citokin profillal jellemezhető effektor T-sejtekké, valamint a pollen NAD(P)H oxidázok inaktivációja a DC-k pollenkezelése előtt, kisebb T-sejt-aktiváló potenciállal rendelkező DC-k kialakulásához vezet.



52. ábra. Az IL-10 termelő autológ T-sejtek karakterizálása pollenkezelt DC-kkel történő együtt tenyésztés után

Az intracelluláris Foxp3 és IL-10 jelölést anti-CD3-mal történő újraaktiválás után végeztük el a DC-kkel aktivált, parlagfű allergiás egyénekből izolált T-sejteken, amikhez az aktiváció utolsó 6 órájában monensint, egy fehérje szekréciót gátló anyagot, adtunk. A density plot-ok az alábbi jelöléseket mutatják: (A) CD25-FITC és Foxp3-PE, (B) CD25-FITC és IL-10-APC, valamint (C) IL-10-APC és Foxp3-PE. A kvadráns statisztikát az izotípus kontrollok és a specifikus ellenanyagok fluoreszcencia intenzitásának összehasonlításával kaptuk. Az adatok 3 független kísérlet reprezentálnak. IDC: kezeletlen, éretlen DC-k; RWP: parlagfű pollenszemekkel kezelt DC-k; RWP^H: hőinaktivált /72°C, 30 perc/ parlagfű pollenszemekkel kezelt DC-k.

Ezekben a kísérletekben sikerült kimutatnunk, hogy a pollenszemek által indukált oxidatív stressz képes aktiválni a DC-ket, tehát adjuvánsként hat. Az a megfigyelésünk, hogy a hővel történő előkezelés, amely megszünteti a pollen NAD(P)H oxidáz aktivitását, nem teljes mértékben szüntette meg a pollenszemek azon képességét, hogy oxidatív stresszt indukáljanak a DC-kben, arra utal, hogy a pollen más komponense(i) is hozzájárulnak ennek a jelenségnek a kialakulásához. Egy korábbi tanulmányban arról beszámoltak, hogy 100 ng/ml LPS ROS képződését váltja ki humán monocita eredetű DC-kben [296]. Azt is kimutatták, hogy a komplex glükán struktúrák, amelyek egy $\alpha(1-3)$ fukozilált központi résszel rendelkeznek, valamint egyes lipidperoxidációs termékek TLR4 ligandként funkcionálhatnak [297-299]. A parlagfű pollenszemek tartalmazznak $\alpha(1-3)$ fukozilált központú glükánokat [304], ezért feltételezzük, hogy ezek a pollen oligoszacharidok képesek oxidatív stresszt indukálni a DC-kben TLR4-mediált útvonalon keresztül.

Az oxidatív stressz aktiválja az NF- κ B-t és a MAPK jelátviteli útvonalakat, amelyek felelősek a pro-inflammatorikus citokin és kemokin gének transzkripciók aktivációjáért makrofágokban és DC-kben [294, 305, 306]. Éppen ezért, az IL-8, a TNF- α és az IL-6 megnövekedett termelése, amely csökkenthető antioxidáns jelenlétében, megerősíti az oxidatív stressz kialakulását a DC-kben pollenkezelést követően. Adataink, melyek azt mutatják, hogy a pollen expozíció által kiváltott oxidatív stressz fokozza a ko-stimuláló molekulák és aktivációs markerek kifejeződését a DC-k felszínén, összhangban vannak egy előző tanulmány eredményeivel, miszerint a X+XO reakcióban termelt $O_2^{\bullet-}$ -ok, a DC-k fenotípusos érését váltják ki, a CD80, a CD83 és a CD86 kifejeződésének fokozásával [307]. Amellett, hogy a ko-stimuláló molekulák kifejeződése növekszik, az oxidatív stressz hatására a DC-k megnövekedett T-sejt osztódást kiváltó képességet is mutatnak [307]. Egy humán tanulmány meggyőző bizonyítékot szolgáltatott arról, hogy az oxidatív stressz erős adjuvánsként szolgálhat az allergiás szenzitizációban. Atópiás betegek, akik intranazálisan neoantigén kezelést kaptak, csak akkor termeltek anti-neoantigén-specifikus IgE-t, ha a neoantigén mellett, pro-oxidatív tulajdonságokkal rendelkező dízelüst partikulák is jelen voltak a szenzitizáció során [308].

Az allergiás megbetegedések szempontjából, az IL-12 termelés meghatározó része a DC működésnek, mivel az alacsony IL-12 szint a Th2 differenciációnak kedvezhet [309]. Az adataink arra utalnak, hogy a pollen expozíciónak kitett DC-k nagyon kis mennyiségben termelnek IL-12-t. Ez megerősíti azt a korábbi megfigyelést, hogy a pollen expozíció félig érett DC-ket eredményez [310]. Nemrégiben kimutatták, hogy az oxidatív stressz aktiválhatja a nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2)- related factor 2 (Nrf2) által közvetített jelátviteli pályákat, amelyek felülírják a IL-12 termelést fokozó TLR útvonalakat [311]. Ennek megfelelően az Nrf2-függő útvonalak lehetnek a felelősek a csökkent IL-12 termelésért DC-

kben [311]. Ezen túlmenően az E₁-fitoprosztánok, a pollenszemek proszttaglandin-szerű lipid mediátorai, gátolják az LPS vagy CD40 kötődés által indukált IL-12 termelést [143]. Mivel az E₁-fitoprosztánok nem-enzimatisz módon, α -linolén savból ROS hatására keletkeznek [143], a pollen NAD(P)H oxidázok által termelt szabadgyököknek szerepük lehet a szintézisükben. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a pollen eredetű reaktív gyökök, legalább két különböző módon módosíthatják a DC-k IL-12 termelését.

Kísérleteinkben a pollenkezelt DC-k CD83 expressziója azt mutatja, hogy a pollen expozíció egy érési programot indít el, azonban csak a sejtek egy töredékében. Fontos megemlíteni, hogy a sejt kultúrákban, a pollenszem/DC arány 1 a 100-hoz volt. A kezelés során a DC-k különböző mértékű reaktív gyök szinteknek voltak kitéve, a pollenszemtől való távolságuk függvényében. Egy nemrégiben javasolt, hierarchikus oxidatív stressz modell leírja a ROS-szintek és a sejt válaszok közötti kapcsolatot [305]. E szerint, az alacsonyabb ROS-szintek az Nrf2 magba történő transzlokációjához vezetnek, ahol ez a transzkripciós faktor elindítja a protektív fázis II enzimek expresszióját, melyek antioxidáns, detoxifikáló, és anti-inflammatórikus hatásúak [305]. Magasabb szintű oxidatív stressz aktiválja a fentebb leírt proinflammatórikus kaskádát aktiválja. Azt feltételezzük, hogy a pollenkezelt DC-k T-sejt polarizáló kapacitásának vizsgálata során, a naív T-sejtek olyan DC-kkel kerültek kapcsolatba, melyek az aktiválási/érési programjuk különböző stádiumában voltak. Ez megmagyarázhatja, hogy miért tudunk egyszerre detektálni Th1 és Th2 citokineket, valamint IL-10-et, a pollenkezelt DC-kkel aktivált T-sejtek felülszójából. Eredményeink alátámasztják azt a korábbi vizsgálatot, amelyben a pollenkezelt DC-k a naív T limfociták kevert profilú citokineket termelő, effektor sejtekké történő fejlődését váltották ki [310].

Eredményeink, amelyek azt mutatják, hogy a pollenkezelt DC-kkel aktivált, nem-allergiás egyénekből származó CD4⁺ T-sejtek nagyobb mennyiségű IFN- γ -t, viszont a parlagfűre allergiás egyénekből származó sejtekkel megegyező mennyiségű Th2 citokineket termelnek, összhangban vannak azokkal a korábbi megfigyelésekkel, amelyek szerint egészséges személyekből származó Th sejtek szignifikánsan nagyobb százalékban termelnek IFN- γ -t, mint az asztmás betegekből származó sejtek, míg az IL-4 termelő Th sejtek arányában nem volt különbség [311]. Azt is kimutatták korábban, hogy az egészséges egyének T-sejtjeihez képest, az atópiás dermatitiszes betegek naív prekursoraiból *in vitro* előállított effektor T-sejtek kevesebb IFN- γ -t termelnek [312]. Habár ennek a jelenségnek a mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, újabb tanulmányban, az IFN- γ gén +874-es pozíciójú polimorfizmusát hozták kapcsolatba az atópiás egyének Th1 sejtjeinek IFN- γ termelésének defektusával [313].

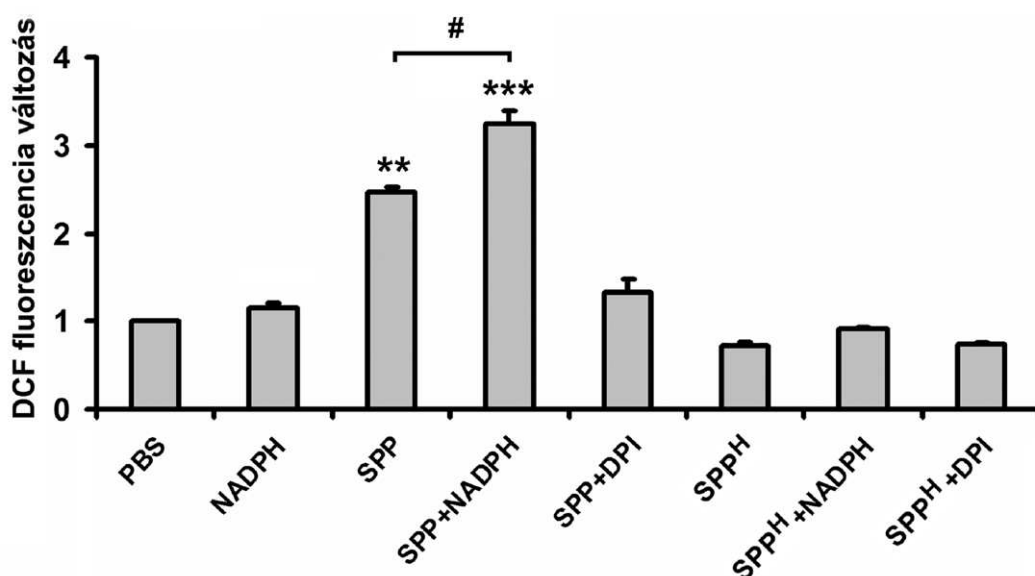
Habár pollenkezelt DC-kkel történő együtt tenyésztés növelte a CD25⁺Foxp3⁺ T-sejtek arányát, és a hőinaktivált pollennel kezelt DC-k tovább emelték ennek a T-sejt

populációnak az arányát, úgy találtuk, hogy a $CD25^+Foxp3^-$ T-sejtek felelősek az emelkedett IL-10 termelésért. A Foxp3-at stabilan expresszálják a $CD4^+CD25^+$ regulatórikus T-sejtek, habár tranziens expresszióját kimutatták aktivált effektor $CD4^+$ T-sejtekben is [314]. Erre a megfigyelésre alapozva, úgy tűnik, hogy a legtöbb Foxp3⁺ T-sejt naív $CD4^+CD25^-$ T limfocitából fejlődött ki, *in vitro* stimuláció hatására. Mivel a hőinaktivált pollennel kezelt DC-k csak a parlagfűre allergiás egyének T-sejtjeinek fokozták jelentősen az IL-10 termelését, feltételezzük, hogy a memória effektor T-sejtek aktivációja állhat a jelenség hátterében. Megfigyelésünk, miszerint az izolált naív T-sejt populáció nyomokban ugyan, de tartalmaz $CD4^+CD45RO^+$ memória T-sejteket (1,8-2,1%), alátámasztja ezt a feltételezést. Habár adataink nem zárják ki annak a lehetőségét sem, hogy az atópiás egyénekből származó naív T-sejtek megnövekedett Tr1 regulatórikus sejt ($CD4^+CD25^{+/-}FOXP3^-IL-10^+$) differenciálódási képességre tesznek szert, a DC-ekkel való együtt tenyésztést követően [315]. A tény, hogy a hőinaktivált pollenszemekkel kezelt DC-k tolerogénebbek, mint a pollennel stimuláltak, tovább erősíti a pollen NAD(P)H oxidázok szerepének fontosságát a DC-k aktivációjában.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a hidratált pollenszemek által kiváltott oxidatív stressznek kettős hatása van a DC-kre. Beindíthatja a DC-k pro-inflammatórikus citokin termelését, hozzájárulva a lokális veleszületett immunválaszok kialakulásához, valamint adjuváns faktorként is szerepelhet, a pollen antigénekkal szembeni szerzett immunválaszok iniciációja során.

5.9. Parlagfű szubpollen partikulák NAD(P)H oxidázai által termelt ROS hatásainak vizsgálata humán monocita eredetű DC-ken

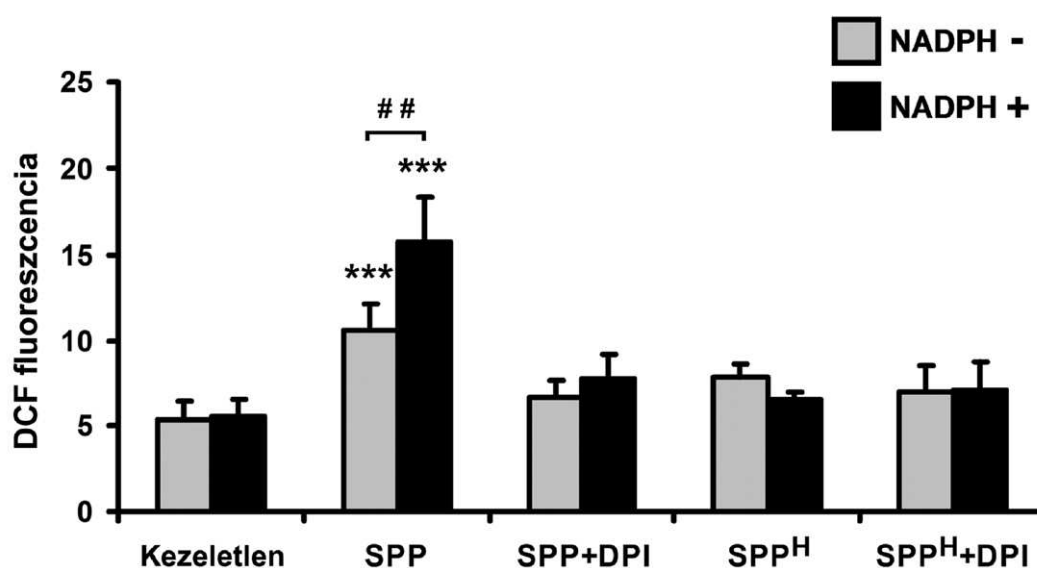
Korábban kimutattuk, hogy az SPP-k – allergén tartalmuk és NAD(P)H oxidázai működése révén - képesek allergiás légúti gyulladást kiváltani szenzitizált szervezetben (5.3. fejezet). Ebben a munkánkban azt vizsgáltuk, hogy a parlagfű pollenszemekből kiszabaduló SPP-k képesek-e aktiválni a monocita eredetű DC-ket, és a folyamatban van-e szerepe az SPP-k NAD(P)H oxidázai által termelt ROS-nak. A kísérletekhez szükséges minden SPP izolálást követően H_2DCF -DA festék segítségével megvizsgáltuk a preparátumok ROS-termelő képességét. A frissen izolált SPP mintákban a DCF fluoreszcencia 2,5-szörös emelkedést mutatott a PBS kontrollhoz viszonyítva, ez a növekedés NADPH jelenlétében tovább fokozódott. Az SPP-k $72^\circ C$ -on 30 percig történő hőkezelése, és DPI jelenléte a fent leírt jelenséget felfüggesztette (**53. ábra**). Ez arra utal, hogy a kísérleteinkhez használt SPP preparátumokban aktívak voltak a NAD(P)H oxidázok.



53. ábra. Az SPP preparátumok NAD(P)H oxidázai által termelt ROS detektálása

A frissen izolált SPP szuszpenziókhöz H_2DCF -DA festéket adva, fluorimetriás módszerrel vizsgáltuk a preparátumok ROS-termelő képességét. Kísérleteinket a pollen NAD(P)H oxidázok szubsztrátjának (NADPH), illetve egyik hatásos gátlószerének (DPI) jelenlétében is elvégeztük. További kontroll kísérletekben az SPP-k hőinaktivált (SPP^H) formáját alkalmaztuk. Az ábra három független kísérlet átlagát mutatja. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, a PBS oldathoz viszonyítva, # $P < 0,05$ az SPP szuszpenzióhoz viszonyítva.

A következő kísérletben SPP szuszpenzióval kezeltünk H_2DCF -DA festékkel töltött DC-
ket, majd vizsgáltuk az intracelluláris ROS szintjének változását. Az SPP kezelés
szignifikáns növekedést eredményezett az intracelluláris DCF fluoreszcenciában, melyet
NADPH jelenléte tovább fokozott. A hőinaktivált SPP-vel (SPP^H) történő kezelés, illetve a
DPI-vel előkezelt SPP-k alkalmazása nem eredményezett DCF fluoreszcencia növekedést a
kezeletlen mintákhoz képest (**54. ábra**). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a DC-kben
detektált intracelluláris ROS-szint növekedést főként az SPP-k NAD(P)H oxidáz aktivitása
okozta.

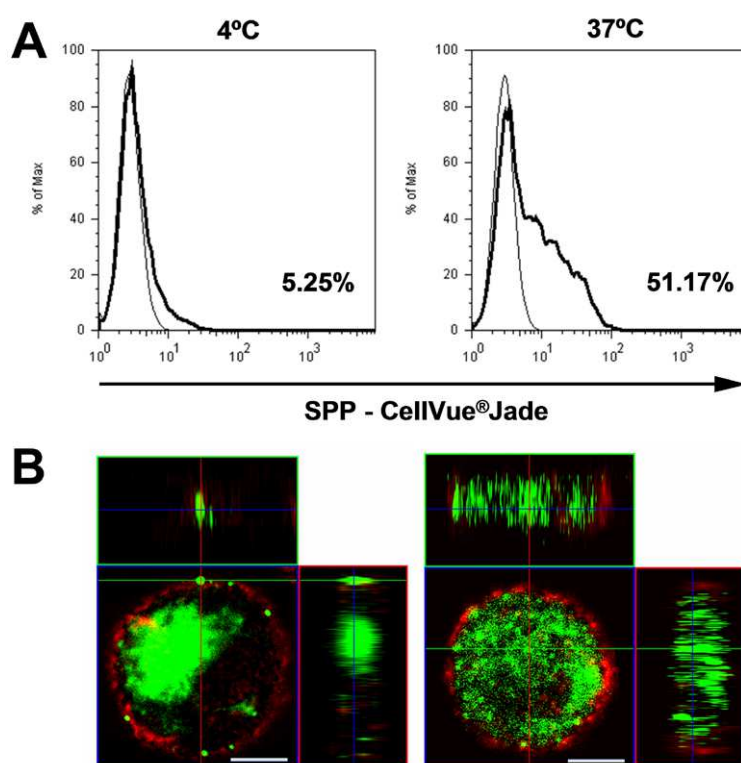


54. ábra. Az SPP-vel kezelt DC-k intracelluláris ROS szintjének vizsgálata

A DC-*ket* H_2DCF -DA festékkel töltöttük meg, majd SPP kezelés - NADPH jelenlétében, vagy
anélkül - után áramlási citometria segítségével vizsgáltuk a DCF fluoreszcenciában
bekövetkező változásokat. Kontroll kísérletekben hőinaktivált SPP-*ket* (SPP^H), valamint a
NAD(P)H oxidáz enzim gátlószerét (DPI) alkalmaztuk. Az ábra három független kísérlet
átlagát mutatja. *** $P < 0,001$, a kezeletlen sejtekhez viszonyítva, ## $P < 0,01$ az SPP-vel kezelt
sejtekhez viszonyítva.

Az intakt parlagfű pollenszemeket méretük (25-30 μm) miatt a DC-k nem tudják
bekebelezni. Ugyanakkor a pollenszemek hidratációja során kiszabaduló SPP-k átlagos
mérete 0,5 – 4,5 μm közé esik, így a DC-k képesek lehetnek ezeknek a részecskének a
fagocitózisára. Ez a folyamat fontos lehet az allergének későbbi prezentációjához, ezért
fontosnak tartottuk megvizsgálni, hogy a DC-k milyen mértékben képesek felvenni az SPP-
ket. Kísérleteinkben fluoreszcensen jelölt SPP-vel kezeltünk meg DC-*ket* 4°C-on, illetve

37°C-on, majd 4 óra elteltével áramlási citométer segítségével vizsgáltuk az SPP pozitív sejtek arányát a sejt kultúrákban. Az SPP pozitív sejtek aránya a 37°C-on történt kezeléseket követően - donortól függően - 25 - 58 % -nak adódott (**55. A ábra**). A citometriás mérések alapján nem dönthető el, hogy az SPP pozitív sejtek valóban felvették-e a partikulákat, vagy azoknak csak a sejtmembránhoz való kötődése eredményezi a pozitivitást, így az SPP-k sejten belüli lokalizációját konfokális mikroszkópos felvételek segítségével is igazoltuk (**55. B ábra**). Sikerült tehát kimutatnunk, hogy a humán DC-k képesek a parlagfű pollenből származó SPP-k felvételére. Ez alátámasztja azokat a korábbi megfigyeléseket, hogy alveoláris makrofágok [316], illetve monocitákból differenciáltatott makrofágok [234] is bekebelezik a különböző fűfélékből származó SPP-ket.

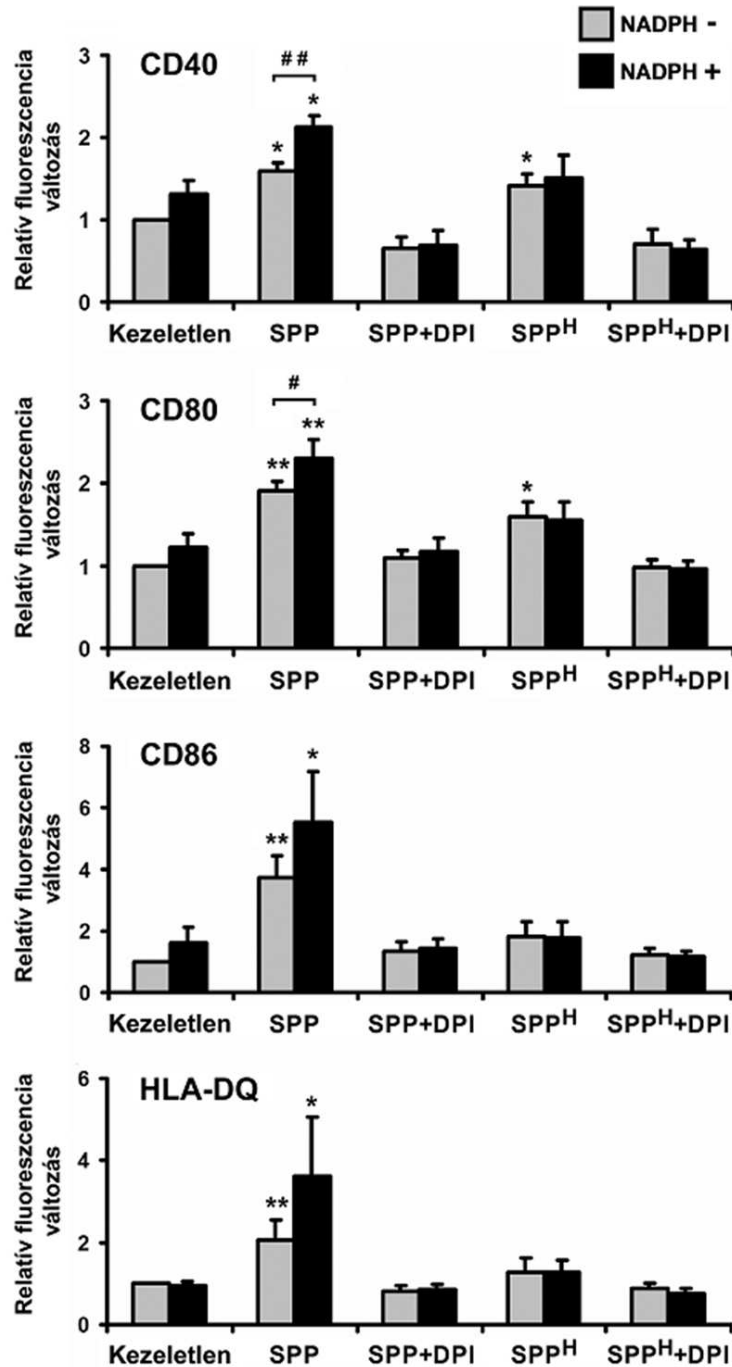


55. ábra. A DC-k SPP felvételének vizsgálata

(A) A DC-ket fluoreszcens CellVue® Jade festékkel konjugált SPP izolátumokkal kezeltük, majd 4 órás inkubációt követően áramlási citometria segítségével FL1 csatornában (530 ± 15 nm) vizsgáltuk az SPP pozitív sejtek százalékos arányát, melyet a hisztogramokon feltüntetett számok jelölnek egy reprezentatív kísérlet adatai alapján. (B) Konfokális lézerpásztázó mikroszkópot alkalmazva megvizsgáltuk a fluoreszcensen jelölt SPP-k (zöld szín) intracelluláris lokalizációját a PE-vel konjugált, DC-SIGN-specifikus ellenanyagokkal jelölt DC-kben (piros szín). Az eredeti nagyítás mértéke: 40x. Méretarány vonal = 5 μ M.

Az SPP kezeléseket követően megvizsgáltuk a DC-k fenotípusos változásait. A vizsgált sejtfelszíni markerek között szerepeltek a CD40, CD80, CD86 kostimulatórikus molekulák, illetve az antigén prezentációban szerepet játszó HLA-DQ fehérje. Az SPP kezelés fokozta mind a négy sejtfelszíni fehérje expresszióját. Ha az SPP kezelés NADPH jelenlétében történt, akkor további növekedés volt tapasztalható a fehérjék expressziós szintjében, de ez az emelkedés csak a CD40, illetve a CD80 molekulák esetében volt szignifikáns. Az SPP^H-val történő kezelés, illetve a DPI-vel előkezelt SPP alkalmazása nem eredményezett statisztikailag szignifikáns változásokat egyik sejtfelszíni protein kifejeződésében sem (**56. ábra**). Az 5.8. fejezetben bemutattuk, hogy az intakt parlagfű pollenszemekkel történő közvetlen kölcsönhatás eredményeként a monocita eredetű DC-k felszínén megnövekszik az aktivációs, illetve érési markerek expressziója. Jelen eredményeink szerint az intakt pollenszemekből felszabaduló SPP-k is hasonló fenotípusos változásokat eredményeznek ezeken a DC-ken. Ha a kezelést NADPH hozzáadásával végeztük el, a fehérjék expressziója tovább fokozódott, DPI jelenlétében viszont a fehérjék kifejeződése az alapszint közelében maradt. Mivel a szubsztrát jelenlétében fokozódott, a NAD(P)H oxidáz gátlószere hatására viszont csökkent a vizsgált fehérjék expressziója, elmondható, hogy az észlelt fenotípusos változásokban – legalább részben – az SPP-k NAD(P)H oxidázai által termelt szabadgyökök játszanak szerepet. Érdekes módon, az SPP-k NAD(P)H oxidázainak hőinaktiválása csak kismértékben csökkentette az általunk vizsgált CD40, illetve CD80 kostimulatórikus molekulák kifejeződését. A jelenség hátterében valószínűleg az áll, hogy a hőkezelés ugyan csökkenti az SPP-k NAD(P)H oxidáz enzimeinek aktivitását (5.3. fejezet), viszont nem befolyásolja számos pollen makromolekula (proteinek, glikoproteinek, lipidek, glikolipidek, vagy különböző szénhidrátok [317]) szerkezetét. Ezeknek a struktúráknak a mintázat felismerő receptorokkal történő érzékelése hozzájárulhat a DC-k aktiválódásához. A különböző növények pollen mintáiban jelenlévő fukozilált glikánokat [318] például a C-típusú lektinek családjába tartozó DC-SIGN molekulák ismerik fel [319]. A CD86 kostimulatórikus fehérje esetében viszont a DC-knek a hőinaktivált SPP-kkel történő kezelése nem vezetett a protein kifejeződésének fokozódásához. Ugyanez a jelenség volt megfigyelhető a HLA-DQ molekulák esetén. A kostimulatórikus molekulák eltérő kifejeződésének ugyanazon aktiváló szignál hatására az lehet az oka, hogy a CD86 molekula más úton szabályozza az allergiás folyamatok kialakulását, mint a CD40 és CD80 kostimulatórikus fehérjék [320].

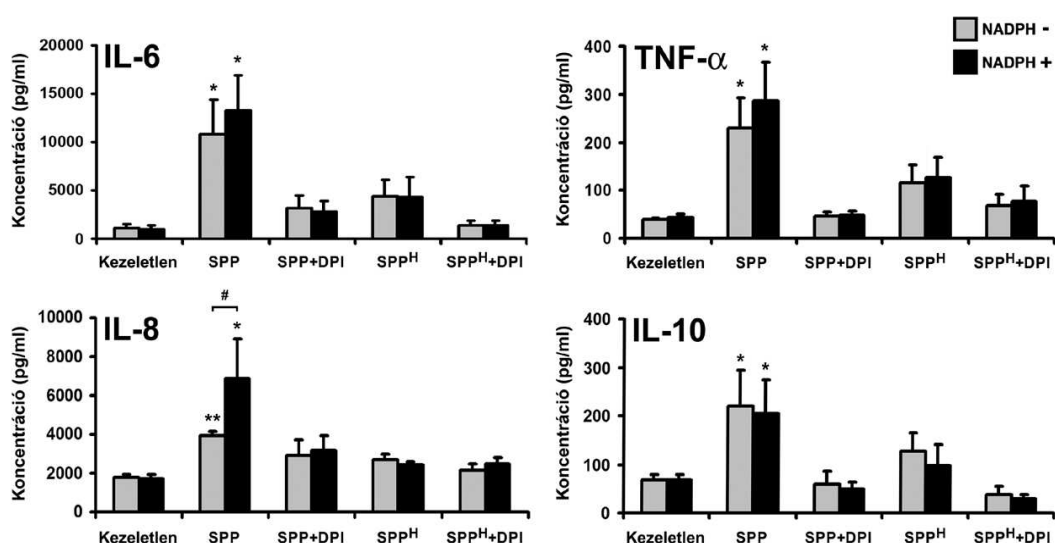
Az oxidatív stressz a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) által mediált jelátvivő útvonalon és az NF- κ B transzkripció faktoron keresztül számos gyulladásos citokin és kemokin termelődését tudja kiváltani, illetve fokozni [294], ezért a következőkben megvizsgáltuk az SPP-vel kezelt DC-k citokin és kemokin szekrécióját.



56. ábra. Az SPP-vel kezelt DC-k fenotípusos változásainak vizsgálata

A DC-eket frissen izolált SPP-vel és az SPP-k hőinaktivált formájával (SPP^H) kezeltük a NAD(P)H oxidáz enzim gátlószerének (DPI) és az enzim szubsztrátjának (NADPH) jelenlétében, illetve anélkül. A 24 órás inkubációt követően áramlásos citometria segítségével vizsgáltuk a sejtfelszíni fehérjék expressziós szintjében bekövetkező változásokat. Az ábra négy független kísérlet átlagát mutatja. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ a kezeletlen sejtekhez viszonyítva, # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ az SPP-vel kezelt sejtekhez viszonyítva.

Megfigyeléseink szerint az SPP kezelés nem indukálta az IL-1 β , illetve az IL-12 pro-inflammatorikus citokinek termelődését (az adatokat nem mutatom), viszont az IL-6, TNF- α , IL-8 és IL-10 fehérjék szekrécióját fokozta. A NADPH szubsztrát jelenléte további növekedést eredményezett az IL-6, TNF- α és IL-8 fehérjék szintjében, viszont a változás csak az IL-8 kemokin esetében volt statisztikailag szignifikáns. A fenotípusos változásokhoz hasonlóan az SPP^H kezelés, illetve a DPI-vel előkezelt SPP alkalmazása nem eredményezett szignifikáns változásokat egyik citokin, illetve kemokin esetében sem (57. ábra).

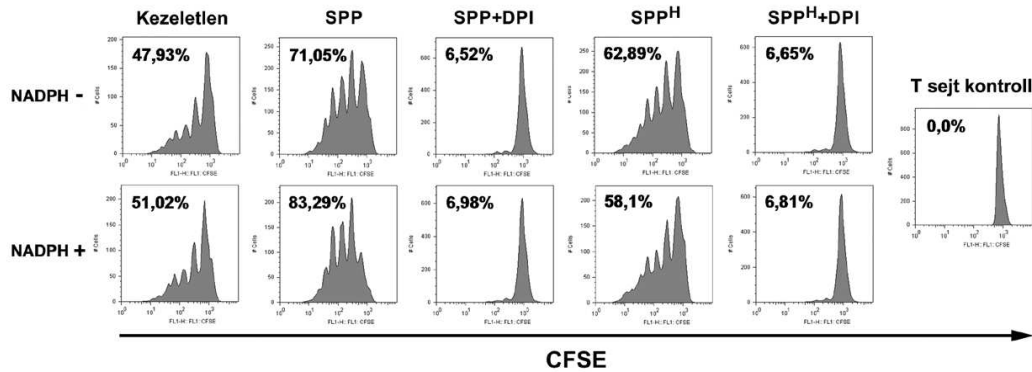


57. ábra. Az SPP-kezelt DC-k citokin és kemokin szekréciójának vizsgálata

A 24 órás kezeléseket követően ELISA módszerrel vizsgáltuk a sejtkultúrák felülszójában a DC-k által termelt citokinek (IL-6, IL-10, TNF- α) illetve kemokin (IL-8) mennyiségét. Az ábra négy független kísérlet átlagát mutatja. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, a kezeletlen sejtekhez viszonyítva, # $P < 0,05$ az SPP-vel kezelt sejtekhez viszonyítva.

A fenotípusos és funkcionális vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy az SPP kezelés aktiválja a DC-ket, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy ez az aktiváció milyen mértékű T-sejt proliferációt képes indukálni allogén naív CD4⁺ T-sejteken. Így SPP-vel kezelt cDC-ket együtt tenyésztettünk CFSE-vel jelölt naív T-sejtekkel, majd 5 nap múlva vizsgáltuk a CFSE jel intenzitását áramlási citométer segítségével. Az SPP-vel kezelt DC-k 71,1 %-os T-sejt proliferációt idéztek elő, míg a NADPH jelenlétében aktiválódott DC-k a T-sejtek 83,3 %-át készítették osztódásra. Az SPP^H-vel előkezelt DC-k a kezeletlen DC-k-hez képest szintén fokozták a T-sejt osztódást, de kisebb mértékben, mint az SPP-kezelt DC-k, illetve az SPP^H-val kezelt DC-k esetében a NADPH jelenléte nem fokozta a T-sejt proliferációt

indukáló képességet. Ugyanakkor a DPI-vel előkezelt SPP, illetve a DPI-vel előkezelt SPP^H alkalmazása esetén a kezelt DC-k nem voltak képesek T-sejt osztódást indukálni a ko-kultúrákban (58. ábra).

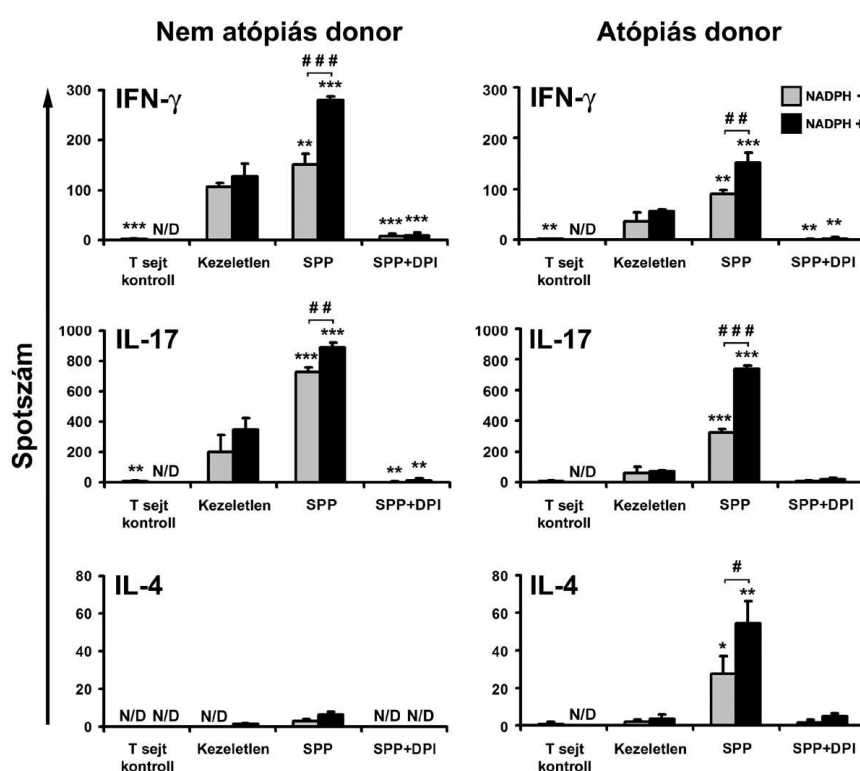


58. ábra. Az SPP-vel kezelt DC-k naív, allogén T-sejt proliferációt kiváltó képességének vizsgálata

A DC-eket frissen izolált SPP-vel és az SPP-k hőinaktivált formájával (SPP^H) kezeltük a NAD(P)H oxidáz enzim gátlószerének (DPI) és az enzim szubsztrátjának (NADPH) jelenlétében, illetve hiányában. A 24 órás inkubációt követően a kezelt DC-eket együtt tenyésztettük CFSE-vel jelölt naív, allogén CD4⁺ T-sejtekkel, majd 5 nap múlva áramlási citometria segítségével vizsgáltuk a T-sejtek proliferációját. Az ábrán a számok az osztódó T-sejtek százalékos arányát jelzik egy reprezentatív kísérlet adatai alapján (N=4).

Az SPP-vel kezelt DC-k allogén T-sejteket stimuláló képességének vizsgálatához az SPP-kezelt DC-eket együtt tenyésztettük parlagfű allergiás, illetve nem allergiás egyének CD3⁺ pan-T-sejtjeivel, melyek egyaránt magukban foglalnak naív, illetve memória T-sejteket is. A donorok atópiás státuszának megállapítása a szérum össz-IgE, illetve a parlagfű specifikus IgE szint alapján történt. A 6 napos ko-kultivációt követően megvizsgáltuk a T-sejtek IL-4, IFN- γ , IL-17 citokin termelését ELISPOT módszer segítségével. A ko-kultúrák felülírójából az IL-10 és TGF- β 1 mediátorokat ELISA módszerrel mértük. Az általunk vizsgált citokinek felvilágosítást adhatnak az adaptív immunválasz polarizáltságáról. Az allogén CD3⁺ pan-T-sejtekkel történő ko-kultivációt követően a sejt kultúrákban nem voltak jelen IL-10 és TGF- β 1 termelő tolerogén T-sejtek (az adatokat nem mutatom), míg az SPP-vel kezelt DC-k aktiválták az IFN- γ illetve IL-17 szekretáló T-sejteket függetlenül a donor atópiás státuszától. Ez alátámasztja több, korábbi vizsgálat megfigyeléseit is, amelyek szerint allergén-specifikus T-sejtek egészséges donorok vérében is jelen vannak [321, 322]. Ugyanakkor az IL-4 citokint termelő T-sejtek aktivációját kizárólag parlagfűre allergiás

egyének mintáiban tudtuk detektálni. Ez a megfigyelés összhangban van annak a korábbi vizsgálatnak az eredményével, amelyben kimutatták, hogy poratka allergénnel történő kezelés csak allergiás gyermekek esetében vált ki Th2 citokin szekréciót [322]. Ezekben a kísérleteinkben az SPP-kezelt DC-k a NAD(P)H oxidáz szubsztrátjának, azaz exogén NADPH-nak a jelenlétében nagyobb mértékű T-sejt aktivációt okoztak mindhárom T-sejt populáció esetében. Ezzel szemben az SPP-kezelt DC-k specifikus NADPH oxidáz inhibitor jelenlétében nem indukálták a T-sejtek aktivációját, mely arra enged következtetni, hogy az SPP NAD(P)H oxidáza által termelt ROS-nak részben szerepe lehet a DC-k T-sejt aktiváló képességének a kialakulásában (59. ábra).



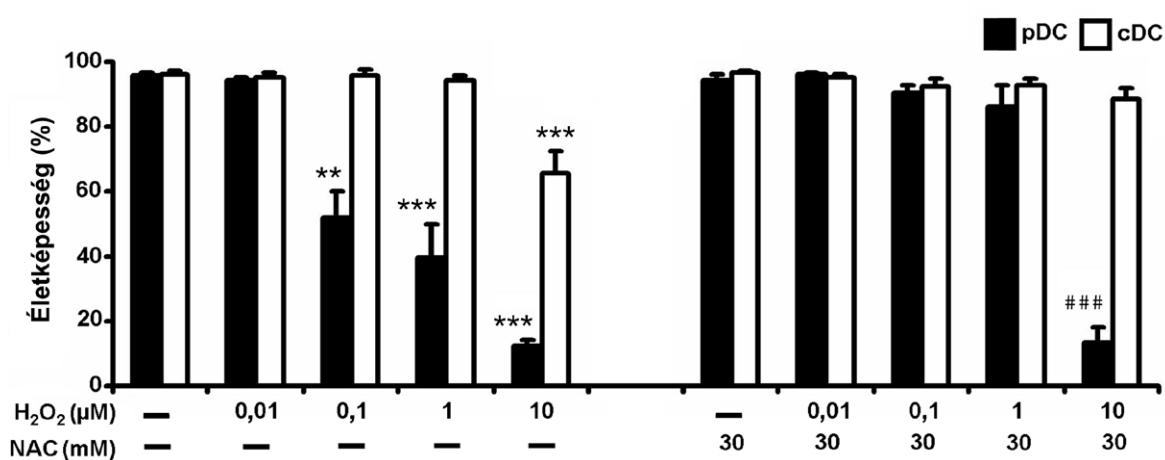
59. ábra. Az SPP kezelés hatása a DC-k allogén T-sejt aktiváló képességére

A DC-ket SPP-vel kezeltük 24 órán keresztül a NAD(P)H oxidáz enzim gátlószerének (DPI) és az enzim szubsztrátjának (NADPH) jelenlétében, illetve anélkül. Ezt követően a kezelt DC-ket parlagfű allergiás (N=3), illetve nem allergiás (N=3) egyének allogén CD3⁺ pan-T-sejtjeivel tenyésztettük együtt. A 6 napos ko-kultivációt követően ELISPOT módszer segítségével vizsgáltuk meg a T-sejtek IFN-γ, IL-17, valamint IL-4 termelését. Az ábra egy-egy reprezentatív kísérlet három párhuzamosának átlagát mutatja. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 a kezeletlen DC-T-sejt ko-kultúrákhoz viszonyítva, #P<0,05, ##P<0,01 az SPP-kezelt DC-T-sejt ko-kultúrákhoz viszonyítva. N/D: nem detektálható.

Összefoglalásként elmondhatjuk, kísérleteinkben sikerült bizonyítanunk, hogy a parlagfű pollenből felszabaduló SPP-k képesek aktiválni a monocita eredetű DC-eket, és ebben a jelenségben szerepet játszanak az SPP-k NAD(P)H oxidázai által termelt szabadgyökök. Ma már széleskörűen elfogadott, hogy a DC-k aktiválásához legalább két különböző szignál együttes jelenléte szükséges. Egyrészt magának az antigénnek a receptor-mediált felvétele, másrészt különböző exogén vagy endogén veszély jeleknek az érzékelése [323]. Ezek alapján elmondható, hogy az SPP-antigének felvételén kívül a DC-k aktiválásához szükséges második szignált az SPP-k ROS-termelő sajátossága biztosíthatja. Mivel ezek az SPP-k méretüknél fogva az alsóbb légutakba is képesek lejutni, esszenciális szerepük lehet a DC-k aktiválásán keresztül az adaptív immunválasz kiváltásában, így a pollen allergénekkal szembeni szenzitizálódásban.

5.10. Oxidatív stressz hatásának vizsgálata a humán plazmacitoid dendritikus sejtekre

A pollen expozíciót követően a nyálkahártyákban létrejövő oxidatív környezet befolyásolhatja a hivatásos APC-ek immunválaszban betöltött szerepét, ezért kísérleteinkben először arra szeretnénk volna választ kapni, hogy a különböző típusú DC-k milyen mértékben képesek kivédeni a ROS hatásait. Kísérleteink első szakaszában humán primer pDC-ket, illetve monocita eredetű DC-ket kezeltünk növekvő koncentrációjú H_2O_2 -dal 24 órán keresztül, majd 7-AAD festék segítségével vizsgáltuk a sejtek életképességét. Az alkalmazott 0,1, 1 és 10 μM -os H_2O_2 koncentrációk mellett a pDC-k életképessége 48, 60, illetve 88%-kal csökkent a kezeletlen sejtekhez képest. Ugyanakkor a DC-k esetében csak a legnagyobb koncentrációjú, a 10 μM -os H_2O_2 kezelésnél detektáltunk szignifikáns életképesség csökkenést. A sejtek antioxidáns (NAC) történő előkezelése mind a pDC-k és mind a DC-k esetében felfüggesztette az oxidatív stressz viabilitásra gyakorolt káros hatását, mely azt mutatja, hogy a sejtek életképesség csökkenését valóban a H_2O_2 kezelés idézte elő (60. ábra).

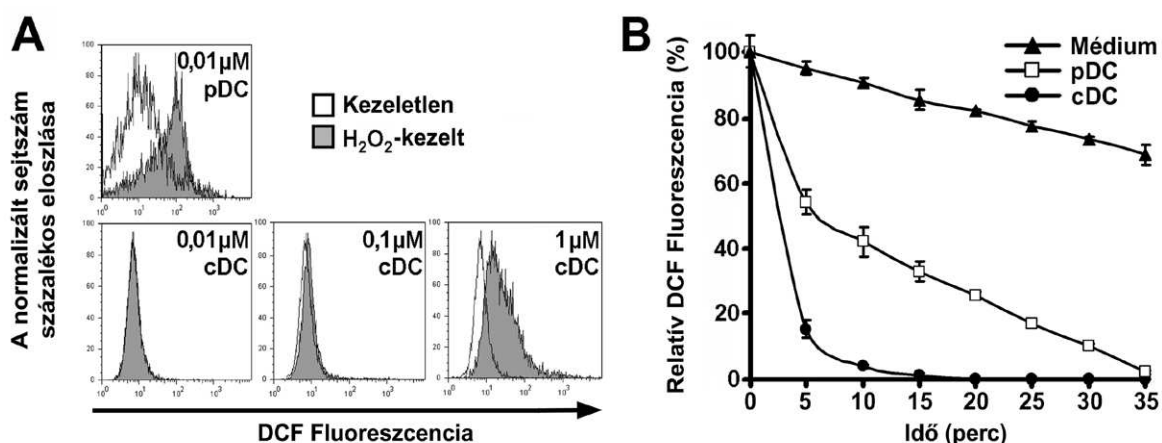


60. ábra. A humán pDC-k és DC-k oxidatív stressz tűrésének összehasonlítása

A sejteket növekvő koncentrációjú H_2O_2 kezelésnek tettük ki, majd 24 órás inkubációt követően a sejtek életképességét áramlási citométer segítségével vizsgáltuk. Az oszlopdiagram az élő sejtek százalékos arányát tünteti fel, melyet 7-AAD, DNS interkalátor festék segítségével határoztunk meg. Az életképesség vizsgálatokat antioxidáns (NAC) jelenlétében is elvégeztük. Az adatok 3 független kísérlet átlagát mutatják. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ a kezeletlen sejtekhez viszonyítva, #### $P < 0,001$ a NAC-előkezelt sejtekhez képest. NAC: N-acetil-cisztein.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a legalacsonyabb H_2O_2 koncentráció ($0,01 \mu\text{M}$), amely nem befolyásolja a pDC-k életképességét, megnöveli-e a sejtek intracelluláris ROS szintjét. A sejteket $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ festékkel töltöttük meg, majd kezelést követően vizsgáltuk a DCF fluoreszcencia változását. A pDC-k esetében már az alacsony koncentrációjú H_2O_2 kezelés is $3,7 \pm 2,3$ -szoros DCF fluoreszcencia növekedést eredményezett, míg a DC-knél csak 100-szor nagyobb H_2O_2 koncentrációnál ($1 \mu\text{M}$) tudtunk a fluoreszcencia intenzitás emelkedését detektálni (**61. A ábra**). A két sejtípus antioxidáns kapacitása közötti különbséget mutatta az is, hogy a DC-k esetében az alacsony koncentrációjú H_2O_2 ($0,01 \mu\text{M}$) kezelést követően, 20 perc elteltével a sejt kultúra felülszójában már nem lehetett kimutatni H_2O_2 -t, míg a pDC kultúrák felülszójában csak 15 perccel később csökkent a H_2O_2 koncentrációja a fluorimetriás módszerrel detektálható határérték alá (**61. B ábra**).

Ezeknek az eredményeknek az alapján elmondható, hogy a pDC-k jóval érzékenyebben reagálnak az oxidatív környezetre, mint a monocita eredetű DC-k. Ez a megfigyelésünk összhangban van egy korábbi tanulmánnyal, amelyben kimutatták, hogy a különböző koncentrációjú H_2O_2 kezelés toxikus hatással van a limfoid eredetű sejtekre (CD4^+ T sejt, CD8^+ T sejt, B sejt, NK sejt) viszont a mieloid eredetű monocitákra nem [324].



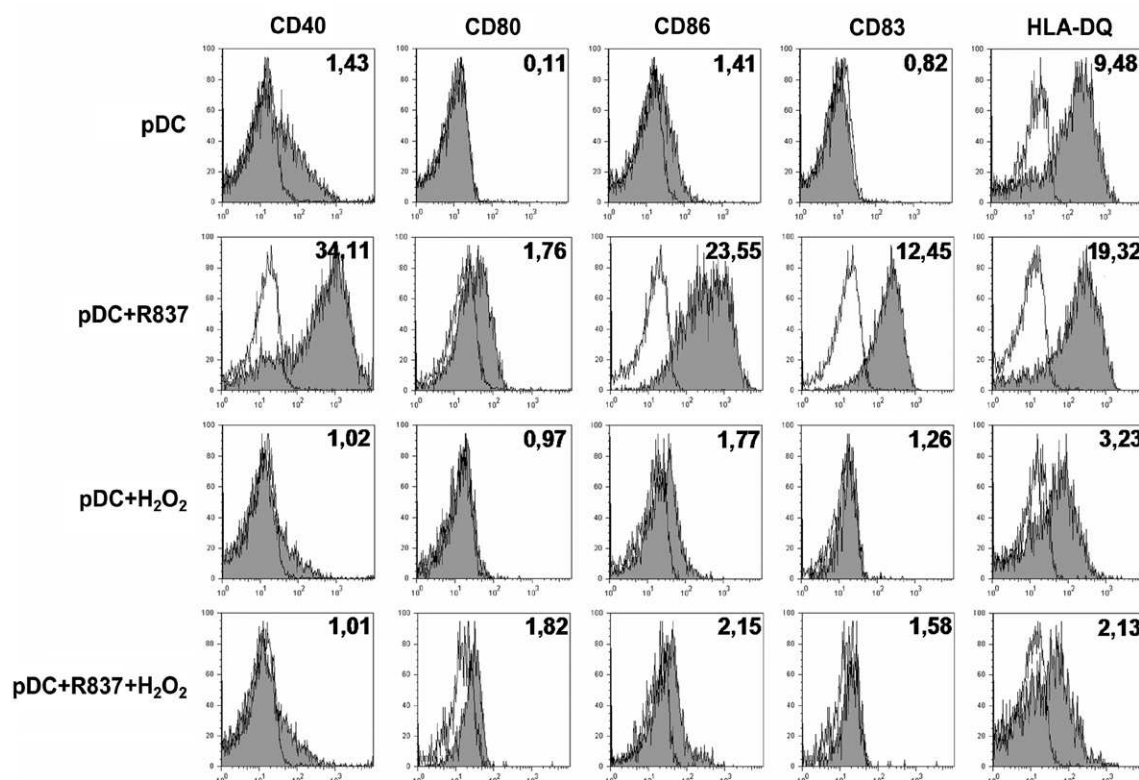
61. ábra. A H_2O_2 kezelés hatása az intracelluláris ROS szintjére pDC-kben és DC-kben, valamint a H_2O_2 lebomlásának kinetikája a sejt kultúrák felülszójában

(A) A DC-kezt $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ festékkel töltöttük meg, majd a H_2O_2 kezeléseket követően áramlós citometria segítségével vizsgáltuk a DCF fluoreszcenciában bekövetkező változásokat. A hisztogramok egy reprezentatív kísérlet adatait mutatják ($N=3$). (B) A DC-kezt alacsony koncentrációjú ($0,01 \mu\text{M}$) H_2O_2 -dal kezeltük meg, majd fluorimetriás módszer segítségével mértük az 5 percenként vett sejtmentes felülszó minták ROS-tartalmát. Az adatok három független kísérlet átlagát mutatják.

A monocita eredetű DC-k oxidatív stresszel szemben tanúsított fokozott ellenállóképessége valószínűleg a sejtek nagyobb antioxidáns kapacitásának köszönhető. Korábban kimutatták ugyanis a DC-k nagymértékű peroxiredoxin termelését [325], valamint kataláz és sejt felszíni tiol-csoport expresszióját [326], amelyek a pDC-kre nem jellemzőek.

Számos korábbi tanulmányban elemezték, hogy az oxidatív stressz hogyan befolyásolja a konvencionális DC-k funkcióit, viszont a pDC-kkel kapcsolatban még nem végeztek ilyen irányú vizsgálatokat. Így a továbbiakban azt tanulmányoztuk részletesebben, hogy az oxidatív stressz hogyan befolyásolhatja a pDC-k immunválaszban betöltött szerepét. Valamennyi további kísérletünkben azt a koncentrációjú H_2O_2 -t ($0,01 \mu M$) alkalmaztuk a kezelésekhöz, amelynél a pDC-k életképessége a kezeletlen mintákéhoz volt hasonló. El akartuk ugyanis kerülni, hogy a nekrotizáló sejtek nagyobb arányú jelenléte befolyásolja kísérleti eredményeinket. A H_2O_2 kezelés által kiváltott fenotípusos változásokat áramlási citométer segítségével detektáltuk. A vizsgált sejt felszíni markerek között szerepeltek kostimulatórikus molekulák (CD40, CD80, CD86), érési marker (CD83), valamint az antigén prezentációban központi szerepet játszó HLA-DQ fehérje. A H_2O_2 kezelés csak kismértékben változtatta meg a CD40, CD80, CD86 illetve CD83 fehérjék expresszióját, ugyanakkor jelentős mértékben csökkentette a HLA-DQ protein szintjét a sejteken. Ha a pDC-ket R837-tel, azaz a TLR7 receptor egyik agonistájával kezeltük, akkor minden általunk vizsgált sejt felszíni marker expressziós szintje ugrásszerűen megnőtt, viszont együtt alkalmazva az aktivátort a H_2O_2 -dal, a H_2O_2 felfüggesztette a TLR7 agonista pDC-kre gyakorolt aktiváló hatását (**62. ábra**). Az R837 - vagy másnéven imiquimod - olyan szintetikus guanozin analóg, mely igen erős IFN-indukáló képességgel bír. Terápiás célból már régóta alkalmazzák a klinikumban, többek között a bőr rákos elváltozásainak kezelésére [327], illetve genitális humán papilloma vírusfertőzés ellen [328].

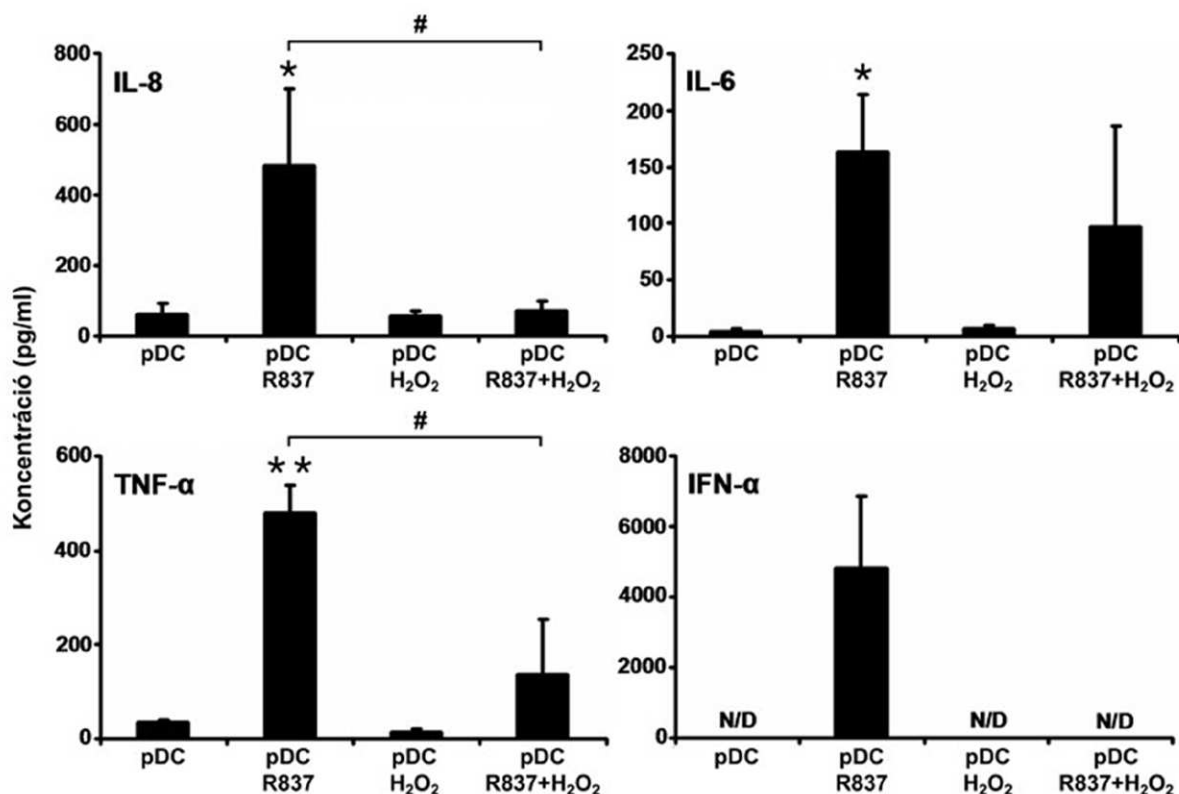
A fenotípusos vizsgálatok eredményei alapján fontosnak tartottuk kizárni, hogy a H_2O_2 esetleges közvetlenül oxidálja az R837-et, és így negatívan befolyásolja annak receptorhoz való kötődését. Fenotípusos vizsgálatainkat megismételtük olyan kondíciók mellett is, ahol a pDC-k R837-tel való kezelését követően, 30 perccel később adtuk a sejtekhez a H_2O_2 -ot, hogy elkerüljük a H_2O_2 kezelés R837-re gyakorolt direkt oxidáló hatását (az adatokat nem mutatom). Ilyen kísérletes kondíciók mellett is az előzőekhez hasonló eredményeket kaptunk, így valószínűsíthetően a H_2O_2 kezelés nem befolyásolja az R837 és a TLR7 receptor közötti kölcsönhatást.



62. ábra. A pDC-k fenotípusának vizsgálata alacsony koncentrációjú H_2O_2 kezelést követően

A pDC-ket $0,01 \mu M$ koncentrációjú H_2O_2 kezelésnek tettük ki TLR7 agonista (R837) jelenlétében, vagy anélkül, majd 24 órás inkubációt követően áramlási citometria segítségével vizsgáltuk a sejtek sejtfelszíni markereinek kifejeződésében bekövetkező változásokat. A fehér színű hisztogramok jelzik az izotípus kontrollokat, míg a számok a relatív fluoreszcencia értékeket (festett minták fluoreszcencia intenzitásának mediánja / az izotípus kontroll fluoreszcencia intenzitásának mediánja) mutatják egy reprezentatív kísérlet adatai alapján ($N=4$).

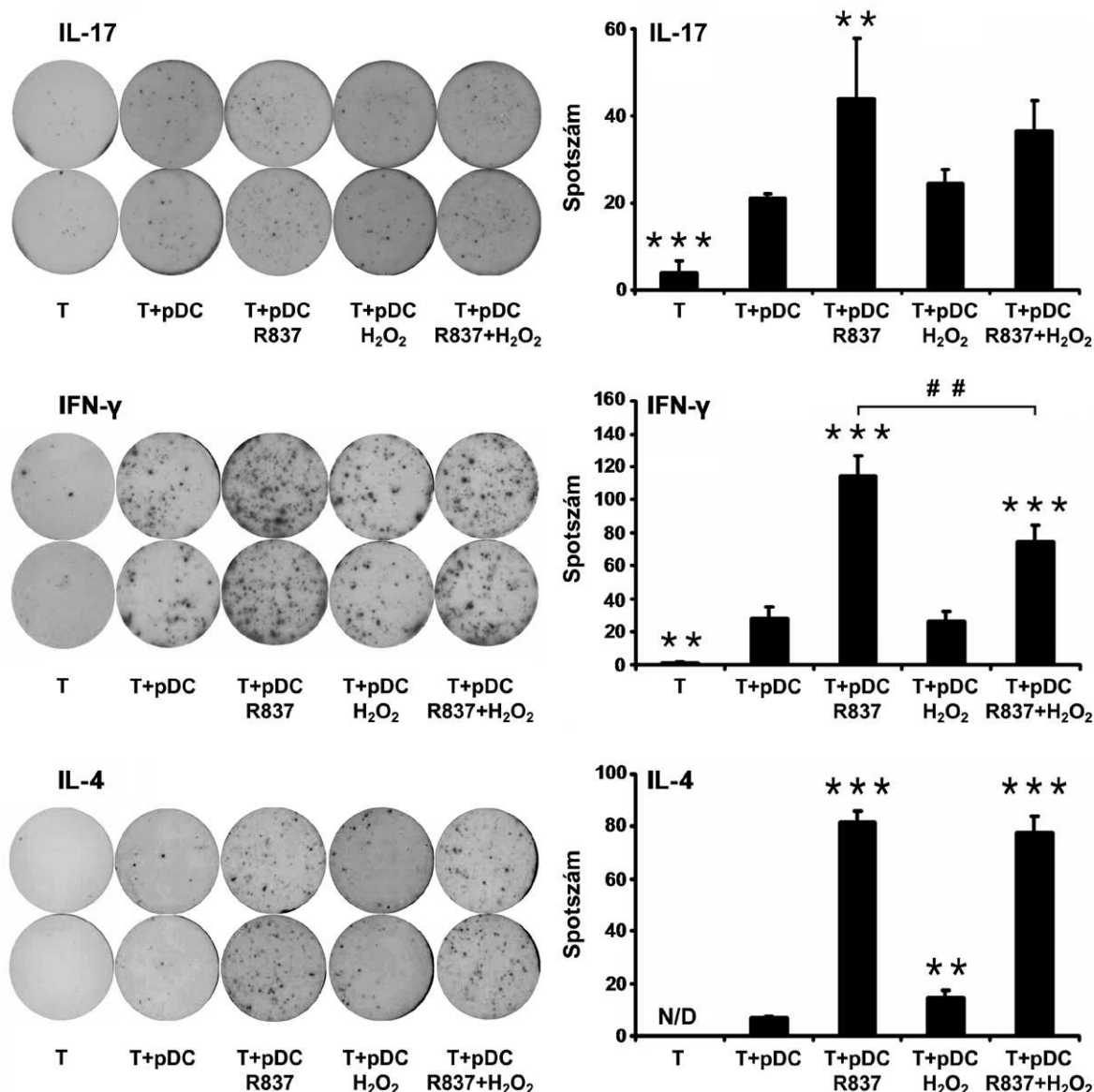
A kezeléseket követően a sejt kultúrák felülúszójából meghatároztuk a sejtek citokin (IL-6, TNF- α , IFN- α) illetve kemokin (IL-8) szekrécióját ELISA módszer segítségével. Önmagában a H_2O_2 kezelés nem indukálta egyik általunk vizsgált mediátor szekrécióját sem, míg a TLR7 agonista jelentős mértékben növelte a sejtek citokin, illetve kemokin termelését. A TLR7 agonista és a H_2O_2 együttes alkalmazása esetén a citokinek, illetve a kemokin mennyisége lecsökkent a felülúszókban a kizárólag TLR7 ligandummal aktivált sejtekéhez képest, ami azt mutatja, hogy az oxidatív stressz gátolja a pDC-k aktiválódását. Az IFN- α esetében csak a TLR7 agonistával kezelt sejtek felülúszójából tudtunk kimutatni a citokint (63. ábra).



63. ábra. A pDC-k citokin, illetve kemokin szekréciója alacsony koncentrációjú H_2O_2 kezelést követően

Aktiválatlan, illetve TLR7 ligandummal (R837) aktivált pDC-ket kezeltünk $0,01 \mu M$ koncentrációjú H_2O_2 -dal, majd 24 óra inkubációt követően ELISA módszer segítségével határoztuk meg a sejtkultúrák felülúszójának citokin illetve kemokin tartalmát. Az ábra három független kísérlet átlagát mutatja. * $P<0,05$, ** $P<0,01$ a kezeletlen sejtekhez viszonyítva, # $P<0,05$ az R837-tel kezelt sejtekhez viszonyítva. N/D: nem detektálható.

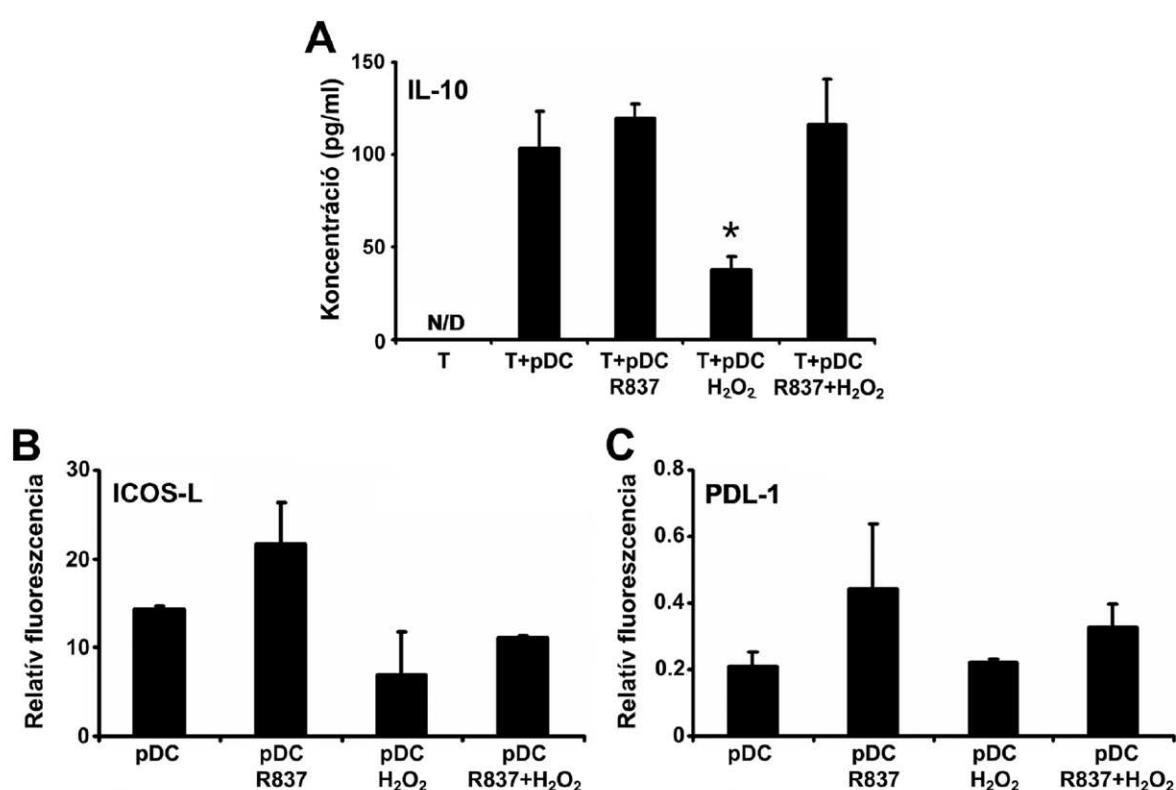
További kísérleteinkben az oxidatív stressznek kitett pDC-k allogén T-sejt aktiváló képességét vizsgáltuk, melyhez H_2O_2 -dal és/vagy R837-tel előkezelt pDC-ket együtt tenyésztettünk allogén $CD3^+$ pan-T-sejtekkel, majd 4 napos ko-kultivációt követően vizsgáltuk a T-sejtek citokin termelését ELISPOT módszer segítségével. A vizsgált citokinek az IL-4, az IL-17 és az IFN- γ voltak, mert ezek a citokinek felvilágosítást adhatnak az adaptív immunválasz polarizáltságáról. Az allogén T-sejtekkel történő ko-kultivációt követően megfigyeltük, hogy a TLR7 agonistával kezelt pDC-k mindhárom citokin termelését fokozzák a T-sejt kultúrában, míg az oxidatív stressznek kitett pDC-k hatékonyabban aktiválják az IL-4-termelő T-sejteket, mint a kezeletlen pDC-k. A H_2O_2 kezelés ugyanakkor nem változtatta meg a pDC-k IFN- γ - vagy IL-17-termelő T limfocitákat aktiváló képességét (64. ábra).



64. ábra. Oxidatív stressznek kitett pDC-k allogén pan-T-sejt aktiváló képességének vizsgálata

Aktívatlan, illetve TLR7 agonistával (R837) aktivált és/vagy H₂O₂-dal kezelt pDC-ket együtt tenyésztettünk CD3⁺ pan-T-sejtekkel, majd 4 napos ko-kultivációt követően vizsgáltuk az IL-17, az IFN-γ, illetve az IL-4 citokint termelő T-sejtek arányát ELISPOT módszer segítségével. Az ábra bal oldalán egy-egy reprezentatív kísérlet spot ábrái szerepelnek, ahol minden egyes pont egy az adott citokint termelő T-sejtnak felel meg (N=3). Az ábra jobb oldala az adott citokint termelő T-sejtek számának átlagát mutatja a sejtkultúrákban három független kísérlet eredményei alapján. **P<0,01, ***P<0,001 a kezeltlen pDC-T-sejt ko-kultúrához viszonyítva, ###P<0,01 az R837 kezelt pDC-T-sejt ko-kultúrához képest. N/D: nem detektálható, T: T-sejt.

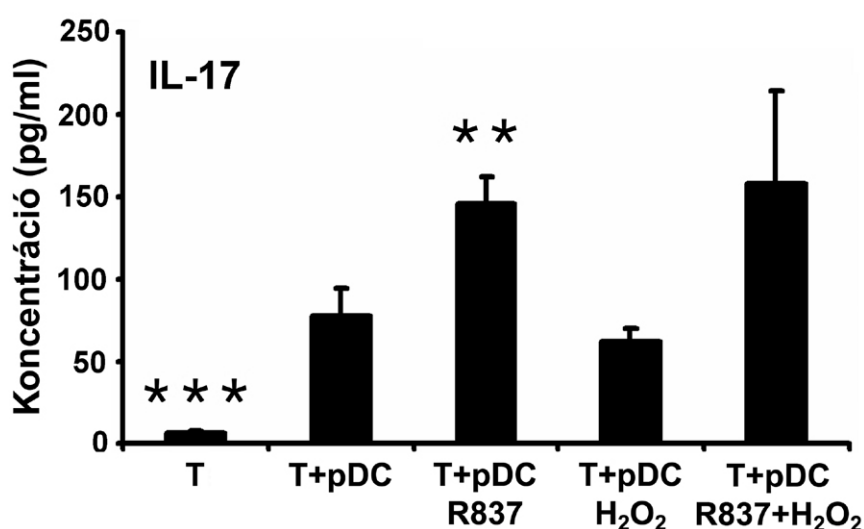
Az oxidatív stressznek kitett pDC-k naív T-sejt polarizáló képességének meghatározásához H_2O_2 -dal és R837-tel előkezelt pDC-eket együtt tenyésztettünk autológ naív T-sejtekkel, majd 6 napos ko-kultivációt követően vizsgáltuk a T-sejtek tulajdonságait. A H_2O_2 -dal előkezelt pDC-eket tartalmazó ko-kultúrák felülszójában a Treg sejtek esetleges kialakulását jelző IL-10 szintje alacsonyabb volt, mint a többi ko-kultúra esetében. Az IL-10 detektálása a felülszóban a ko-kultúrában megjelenő IL-10 termelő T-sejtekre utal, mivel a primer pDC-k nem képesek ennek a citokinnek a termelésére. A H_2O_2 -dal előkezelt pDC-k fenotípusa sem kedvez a Treg sejtek kialakulásának, mivel az oxidatív stressz nem fokozta a tolerogén markerek (ICOS-L, PDL-1) expresszióját a pDC-ken (65. ábra).



65. ábra. Oxidatív stressznek kitett pDC-k naív, autológ T-sejt aktiváló képességének vizsgálata az IL-10 termelő T-sejtek kialakulása szempontjából

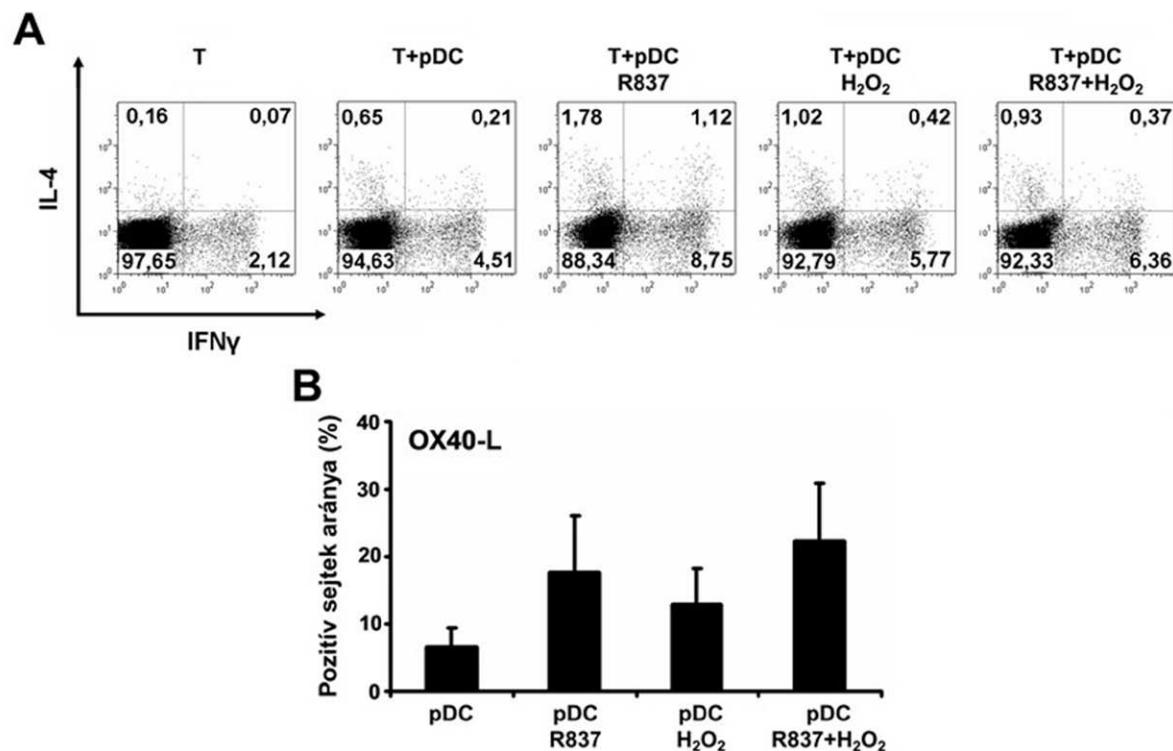
(A) Aktiválatlan, illetve TLR7 agonistával (R837) aktivált és/vagy H_2O_2 -dal kezelt pDC-eket ko-kultiváltunk naív, autológ $CD4^+CD45RA^+$ T-sejtekkel, majd 6 napos ko-kultivációt követően vizsgáltuk a sejt-kultúrák felülszójának IL-10 tartalmát ELISA módszerrel. A H_2O_2 , illetve az R837 kezeléseket követően áramlási citométer segítségével vizsgáltuk az ICOS-L (B) és a PDL-1 (C) fehérjék kifejeződését a pDC-ken. Az ábrák három független kísérlet átlagát mutatják. * $P < 0,05$ a kezeletlen pDC-T-sejt ko-kultúrához viszonyítva. N/D: nem detektálható, T: T-sejt.

Ezt követően megvizsgáltuk az IL-17 citokin szintjét a ko-kultúrák felülúszójában, és azt találtuk, hogy a H_2O_2 -dal előkezelt pDC-k nem indukálták az IL-17 termelő T-sejtek keletkezését (66. ábra). Ugyanakkor a ko-kultúrákban intracelluláris citokin festéssel kimutattuk, hogy a naív autológ T-sejtekkel történő ko-kultiváció előtt oxidatív stressznek kitett pDC-k inkább Th2 (IL-4 termelő T-sejtek), mint Th1 (IFN- γ termelő T-sejtek) irányú polarizációt segítenek elő, valószínűleg a fokozott OX40-L kifejeződés következtében (67. ábra).



66. ábra. Oxidatív stressz hatása a pDC-k Th17 sejt polarizáló képességére

Aktiválatlan, illetve TLR7 agonistával (R837) aktivált és/vagy H_2O_2 -dal kezelt pDC-eket együtt tenyésztettünk naív, autológ $CD4^+CD45RA^+$ T-sejtekkel, majd 6 napos ko-kultivációt követően ELISA módszer segítségével megmértük a ko-kultúrák felülúszójának IL-17 citokin tartalmát. Az ábra három független kísérlet átlagát mutatja. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ a kezeletlen pDC-T-sejt ko-kultúrához viszonyítva. T: T-sejt.



67. ábra. Oxidatív stressz hatása a pDC-k Th1/Th2 sejt polarizáló képességére

(A) Aktiválatlan, illetve TLR7 agonistával (R837) aktivált és/vagy H₂O₂-dal kezelt pDC-ket együtt tenyésztettünk naív, autológ CD4⁺CD45RA⁺ T-sejtekkel, majd 6 napos ko-kultivációt követően a T-sejteket újraaktiváltuk nem antigén specifikus, poliklonális aktivátorokkal, majd intracelluláris citokin festést követően, áramlási citométer segítségével meghatároztuk az IFN-γ és IL-4 citokint termelő T-sejtek arányát. A dot blot-okon látható számok az IFN-γ illetve IL-4 pozitív T-sejtek százalékos arányát jelzik egy reprezentatív kísérlet adatai alapján (N=3). (B) H₂O₂-dal, illetve R837-tel kezelt pDC-k OX40-L expressziójának vizsgálata áramlási citométer segítségével. Ennek a proteinnek a kifejeződése a pDC-ken elősegíti a naív T-sejtek Th2 irányú differenciálódását. Az ábra három független kísérlet átlagát mutatja. T: T-sejt.

Korábbi vizsgálatok szerint a DC-ken az oxidatív stressz fokozza az MHC-I és MHC-II antigén-prezentáló fehérjék, valamint a kostimulatórikus molekulák (CD80 és CD86) és érési markerek (CD83) sejtfelszíni expresszióját [307, 329]. Eredményeink szerint a pDC-k a DC-ktől eltérően reagálnak az oxidatív stresszre, mivel a H₂O₂ kezelés nem eredményezett szignifikáns növekedést egyik általunk vizsgált kostimulatórikus molekula expressziójában sem, illetve csökkentette az antigén-prezentáló HLA-DQ molekula expresszióját. Ezen kívül az oxidatív stressz felfüggesztette a TLR7 receptor agonista (R837) pDC-kre gyakorolt

aktiváló hatását. Az oxidatív stressznek kitett pDC-k kemokin, illetve citokin szekrécióját vizsgálva hasonló eredményeket kaptunk. A H_2O_2 kezelés nem növelte az általunk vizsgált IL-8, IL-6, TNF- α és IFN- α szekrécióját, viszont gátolta a TLR7 ligand által kiváltott fokozott kemokin, illetve citokin termelést. Ezzel szemben, korábbi megfigyelések szerint a H_2O_2 kezelés hatására a DC-k TNF- α , illetve IL-8 szekréciója fokozódik [294]. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy az IL-6, IL-8 illetve TNF- α szekréciója az NF- κ B jelátviteli útvonalon keresztül szabályozódik [330]. A H_2O_2 -dal kezelt aktivált, illetve memória T sejtek csökkent citokin termelését is az NF- κ B molekula gátolt funkciójával magyarázzák [331]. A pDC-k IFN termelése olyan szignál útvonalakon keresztül valósul meg, melyben központi szerepet játszik az IRF7 molekula [332]. Egér modellben kimutatták, hogy az öregedő pDC-k, melyeket az öregedési folyamatok következtében nagyobb fokú oxidatív stressz ért, csökkent IFN- α szekrécióval válaszolnak TLR9 receptor aktiválást követően, mely az IRF7 csökkent aktivációjának a következménye [333]. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy H_2O_2 kezelt pDC-k alacsony kemokin illetve citokin szekréciójának molekuláris hátterében is az NF- κ B, illetve az IRF7 szignalizációs útvonalak blokája állhat.

Megvizsgáltuk az oxidatív stressznek kitett pDC-k T-sejt aktiváló, illetve T-sejt proliferációt indukáló képességét is. Ismert, hogy az éretlen állapotban lévő DC-k IL-10 termelő T-sejtek keletkezését váltják ki, míg a pDC-k csak érett állapotban, azaz antigén ingert követően képesek ezeknek a T sejteknek a kialakulását előidézni [334]. Az érett pDC-ket ugyanis nagymértékű ICOS-L expresszió jellemzi, és ez a fehérje központi szerepet játszik az IL-10 termelő T-sejtek kialakulásában [334]. Eredményeink azt mutatják, hogy a H_2O_2 -dal kezelt pDC-ken az ICOS-L kifejeződése csökken, míg egy másik, a Treg polarizációnak kedvező molekula, a PDL-1 [177] sejtfelszíni expressziója nem változik. Nem meglepő tehát, hogy a H_2O_2 -dal kezelt pDC-knek a Treg sejtek kialakulását segítő potenciálja nagyon alacsony. Bár a pDC-k képesek Th17 irányú polarizációt is létrehozni [335], kísérleteinkben a H_2O_2 -dal kezelt pDC-k nem indukálták a naív T-sejtek Th17 irányú differenciálódását. Az oxidatív stressznek kitett pDC-k Th1/Th2 polarizáló képességét vizsgálva megállapítottuk, hogy a ROS hatásának kitett pDC-k inkább az anti-inflammatorikus Th2 irány kialakulásának kedveztek, mind az autológ, mind az allogén T-sejt aktiváció során. Ezt támasztotta alá az a megfigyelésünk is, hogy a pDC-k OX40-L expressziója fokozódott H_2O_2 kezelést követően. Az OX40-L ugyanis a Th2 válaszok kialakulását segíti a DC-T-sejt kölcsönhatás során [336].

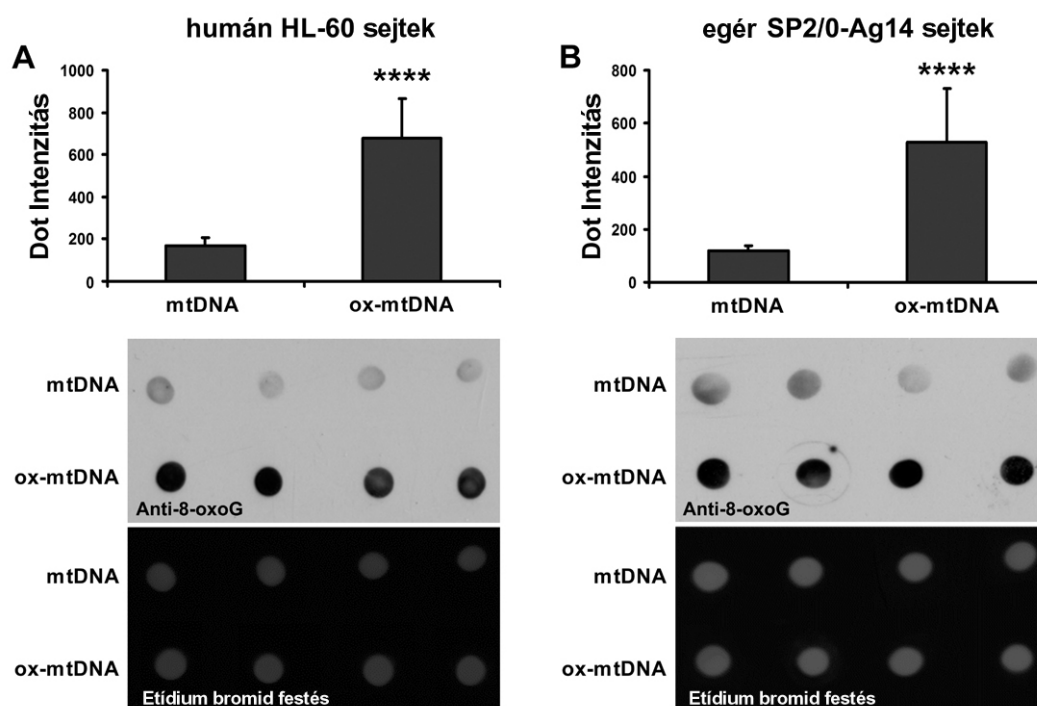
Eredményeink összegzéseként elmondható, hogy az *in vivo* körülmények között oxidatív stressznek kitett pDC-k valószínűleg anti-inflammatorikus, azaz gyulladáscsökkentő tulajdonsággal bírnak, szemben a DC-kkel, melyek főleg az inflammatorikus Th1 irányú válaszok kialakulásának kedveznek.

5.11. A natív és az oxidatíván módosított extracelluláris mitokondriális DNS hatása a humán plazmacitoid dendritikus sejtek működésére

Nemrégiben derült ki, hogy az asztmás egyének légútjaiba vándorló, aktiválódott eozinofil granulociták mtDNS-t bocsátanak ki magukból [337]. Az extracelluláris mtDNS, amely - az endoszimbionta elméletnek megfelelően – a bakteriális DNS-hez hasonlóan metilátlan CpG oligonukleotid szekvenciákat hordoz, az immunrendszer sejtjeit aktiválhatja. A gyulladásos sejtek által termelt szabadgyökök az extracelluláris mtDNS-t oxidatíván módosíthatják. Ebben a kísérletsorozatunkban azt vizsgáltuk, hogy az extracelluláris térbe jutó mtDNS hogyan befolyásolja a humán pDC-k fenotípusos, illetve funkcionális sajátosságait, és ezáltal az immunválaszban betöltött szerepüket. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy az mtDNS oxidatíván módosított formájának vajon hasonló, vagy eltérő az immunmoduláló kapacitása, mint a natív formának.

A kísérleteinkhez szükséges oxidált mtDNS előállításához humán HL-60, és egér SP2/0-Ag14 sejteket Antimycin A-val, a mitokondriális elektrontranszportlánc III. komplexének specifikus inhibitorával kezeltünk. Az optimális DNS károsító hatás meghatározásához a sejteket emelkedő koncentrációjú Antimycin A-val kezeltük 2 órán át. A mitokondrium ROS termelését MitoSoxTM Red-del, egy fluoreszcens, mitokondriális szuperoxid indikátorral mutattuk ki, míg a sejtek életképességét 7-AAD festékkel határoztuk meg. A humán és egér sejtek 100 µg/ml Antimycin A kezelését követően a MitoSoxTM Red fluoreszcenciája jelentősen megemelkedett, míg a sejtek életképessége nem változott. Az Antimycin A magasabb (200 µg/ml) koncentrációja nem növelte tovább a MitoSoxTM Red fluoreszcenciáját, de 30%-al csökkentette a sejtek életképességét (ezeket az adatokat nem mutatom). Ezekre a megfigyelésekre alapozva, a pDC-k *in vitro* és *in vivo* stimulálásához a natív mtDNS-t kezeletlen, míg az oxidatíván károsított mtDNS-t 100 µg/ml Antimycin A-val kezelt sejtekből izoláltuk. Annak ellenőrzésére, hogy a sejtek Antimycin A kezelése vajon valóban okozott-e oxidatív mtDNS károsodást, dot blot technikával meghatároztuk a mtDNS mintákban a 8-oxoG szinteket. Az Antimycin A-val kezelt HL-60 sejtek mtDNS-ében ~5-ször több 8-oxoG volt, mint a kezeletlen sejtek mtDNS-ében (**68. A ábra**). A 8-oxoG hasonló szintű emelkedése volt megfigyelhető Antimycin A-val kezelt SP2/0-Ag14 sejtek mtDNS-ében is (**68. B ábra**). A bázisok károsítása mellett az oxidatív stressz egyszálú, vagy kétszálú DNS töréseket is okozhat, ami a DNS fragmentálódásához vezethet. A natív, és az oxidált mtDNS integritásának összehasonlításához, izolálás után megfuttattuk a mintákat standard agaróz gélen, majd megfestettük őket interkalálódó SYBR Green I fluoreszcens festékkel. Mind a HL-60 sejtekből, mind a SP2/0-Ag14 sejtekből izolált natív, és oxidált

mtDNS minták elektroforetikus mobilitása azonos volt, ami arra utal, hogy az Antimycin A kezelés nem okoz kimutatható mtDNS fragmentációt (ezeket az adatokat nem mutatom).

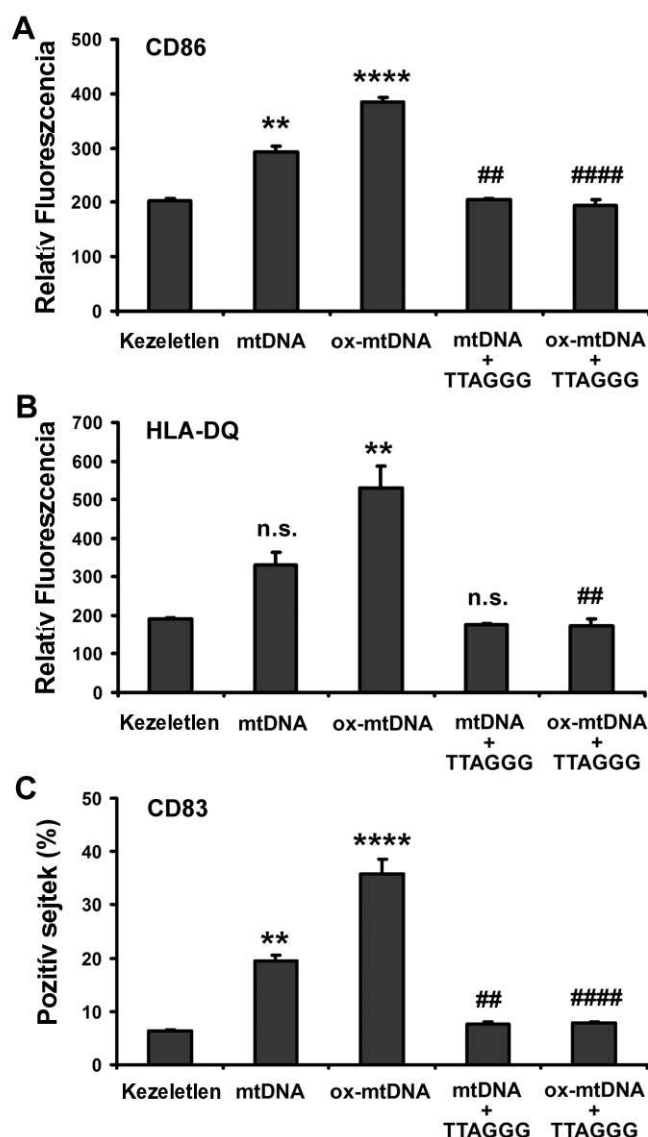


68. ábra. A 8-oxoG tartalom kimutatása izolált mtDNS mintákban

Az oxidált mtDNS-t (ox-mtDNS) Antimycin A-val kezelt humán HL-60 (A), vagy egér SP2/0-14Ag (B) sejtekből szeparáltuk, kontrollként kezeletlen sejtekből izolált natív mtDNS-t használtunk. A 8-oxoG mennyiségét az izolált mtDNS-ben dot blot módszerrel határoztuk meg. A diagramok 12 dot intenzitását mutatják 3 független kísérletből, az eredményeket átlag $\pm$ SE formában ábrázoltuk. Az alsó panelek 4-4 párhuzamos minta, a humán és az egér sejtekből izolált natív, illetve oxidált mtDNS reprezentatív blotjait mutatják. Ugyanazokat a blotokat a DNS felvitel mennyiségi kontrolljának céljából, etídium bromiddal is megfestettük. **** $P < 0,0001$ vs mtDNS kezeletlen sejtekből.

A mtDNS immunmoduláns hatásainak vizsgálatához, frissen izolált humán pDC-ket kezeltünk HL-60 sejtekből kivont natív, és oxidált mtDNS-sel. A kezelést követően áramlási citometriával elemeztük egy kostimulációs molekula (CD86), egy specifikus érési marker (CD83), és egy antigén-prezentáló molekula (HLA-DQ) kifejeződését a pDC-ken. A pDC-k natív mtDNS-sel történő kezelése után jelentősen megnőtt a CD86 (**69. A ábra**) és a CD83 (**69. C ábra**) kifejeződése, míg HLA-DQ expressziós szintje (**69. B ábra**) ugyan kisebb mértékben, de szintén szignifikánsan megemelkedett. Amikor a sejteket magas 8-oxoG tartalmú mtDNS-sel kezeltük, az minden vizsgált molekula fokozottabb kifejeződését

eredményezte, ami arra utal, hogy az oxidált mtDNS fenotípusos változást kiváltó képessége a pDC-ken erőteljesebb, mint a naív mtDNS-é (69. A-C ábra).

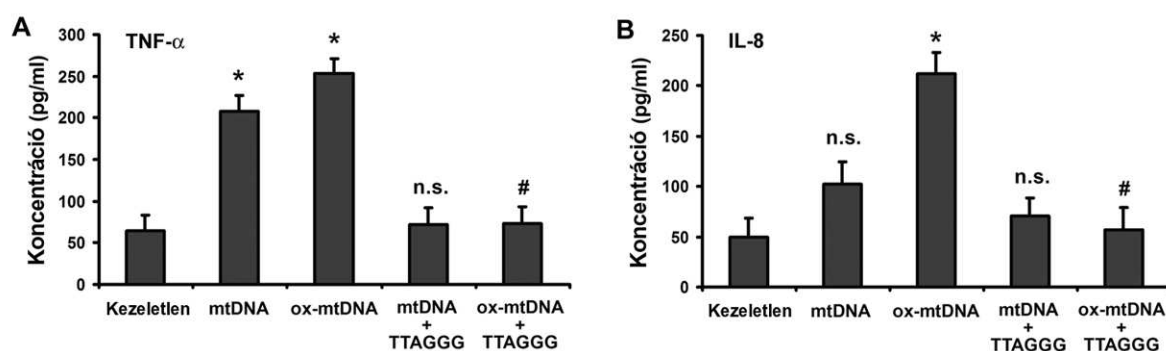


69. ábra. Natív, vagy oxidált mtDNS-sel kezelt primer humán pDC-k fenotípusos vizsgálata

Primer humán pDC-ket kezeltünk natív, vagy oxidált mtDNS-sel (ox-mtDNS). Párhuzamos kísérletekben a pDC-ket specifikus TLR9 antagonistával (TTAGGG) inkubáltuk elő 1 órán át, majd ezután kezeltük natív, vagy oxidált mtDNS-sel. Egy napos aktivációt követően áramlási citometriával határoztuk meg a CD86 (A), a HLA-DQ (B), és a CD83 (C) kifejeződését. A relatív fluoreszcenciát a megfelelő izotípus-kontrollokra vonatkoztatva számoltuk ki mindegyik monoklonális Ab esetében. Az adatokat 3 független kísérlet átlaga $\pm$ SE formában ábrázoltuk. ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$ vs kezeletlen sejtek; ## $P < 0,01$, #### $P < 0,0001$ vs mtDNS-sel, vagy oxidált mtDNS-sel (kezelt sejtek).

Az endoszómális TLR9 receptor a mikrobiális DNS érzékelésére specializálódott [338], ezért azt feltételeztük, hogy a CpG motívumokat tartalmazó mtDNS a hatását a pDC-kre ezeken a receptorokon keresztül fejt ki. Hipotézisünk tesztelésére megismételtük a mtDNS kezeléseket a TLR9 specifikus kompetitív inhibitorának (TTAGGG ODN) a jelenlétében. Az eredmények azt mutatták, hogy a sejtek előkezelése a TLR9 antagonistával megakadályozta a pDC-k fentebb leírt fenotípusos változásainak kialakulását, függetlenül a mtDNS oxidáltsági állapotától (**69. A-C ábra**). Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a pDC-knek a natív, illetve az oxidált mtDNS kezeléssel kiváltott fenotípusos érése főleg a TLR9 receptoron keresztül valósul meg.

A következő kísérletben a natív, és az oxidált mtDNS-sel kezelt pDC-k felülúszójából ELISA-val határoztuk meg az IL-8 és TNF- α szinteket. A natív mtDNS-sel történő kezelés elősegítette mind a TNF- α (**70. A ábra**), mind az IL-8 (**70. B ábra**) szekrécióját, azonban statisztikailag szignifikánsan csak a TNF- α mennyiségét növelte meg (**70. A ábra**).



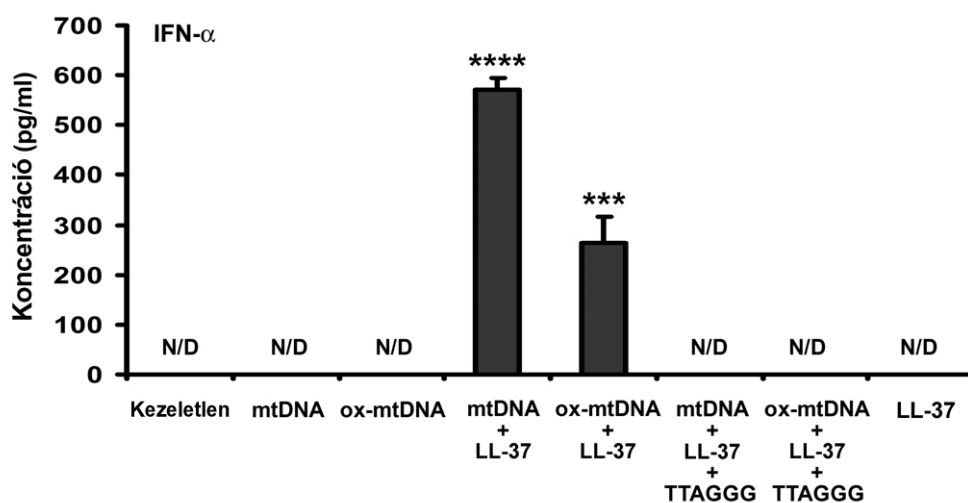
70. ábra. Natív, vagy oxidált mtDNS-sel kezelt primer humán pDC-k citokin és kemokin termelése

A primer humán pDC-k által termelt TNF- α (A) és IL-8 (B) koncentrációját 24 órával a natív, vagy az oxidált mtDNS-sel (ox-mtDNS) történő kezelés után ELISA módszerrel határoztuk meg. Párhuzamos kísérletekben a pDC-ket specifikus TLR9 antagonistával (TTAGGG) inkubáltuk elő 1 órán át, majd ezután kezeltük natív, vagy oxidált mtDNS-sel. Az adatokat 3 független kísérlet átlaga $\pm$ SE formában ábrázoltuk. * $P < 0,05$ vs kezeletlen sejtek; # $P < 0,05$ vs mtDNS-sel, vagy oxidált mtDNS-sel kezelt sejtek.

A natív mtDNS-kezeléshez viszonyítva, amikor a primer pDC-ket oxidált mtDNS-sel aktiváltuk, mind a két mediátor mennyisége nagyobb volt a sejt kultúrák felülúszójában, viszont az IL-8 koncentrációjában megfigyelhető változás szembetűnőbb volt, mint a TNF- α koncentrációjában (**70. A és B ábra**). Hasonlóan a fenotípusos vizsgálatoknál

megfigyeltekhez, a TLR9 antagonista jelenléte megakadályozta mind a TNF- α , mind az IL-8 fokozott termelődését, a natív és az oxidált mtDNS-sel kezelt pDC-kben is (**70. A és B ábra**).

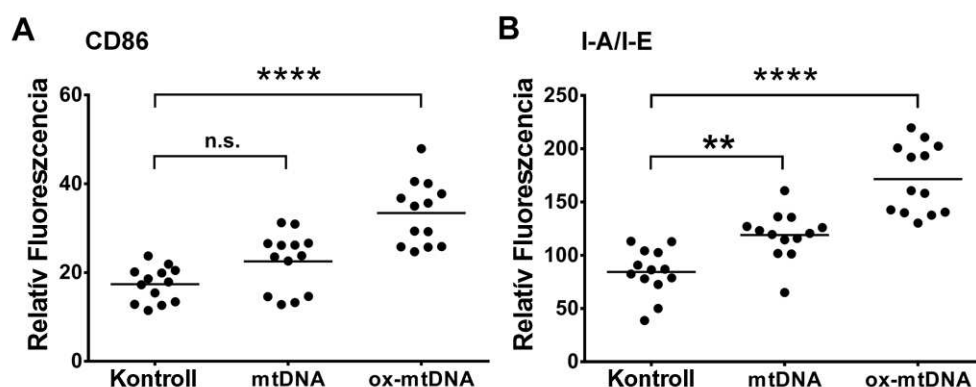
A pDC-ket professzionális I. típusú IFN- α termelő sejteknek tekintik [155], ezért megvizsgáltuk a mtDNS kezelés IFN- α szekrécióra kifejtett hatását is. Az IFN- α koncentrációját ELISA-val megmértük a natív, és oxidált mtDNS-sel kezelt primer humán pDC-k felülűszójában. Eredményeink szerint sem a natív, sem az oxidált mtDNS nem indukált IFN- α szekréciót a pDC-kben (**71. ábra**). Korábban megfigyelték, hogy az extracelluláris nukleáris DNS sem képes önmagában IFN- α termelést kiváltani a humán pDC-kben, ha azonban a DNS-t együtt adták a sejtekhez katelicidinnel (LL-37), egy antimikrobiális peptiddel, akkor viszont igen [339]. Ezek alapján, mielőtt a sejt kultúrához adtuk volna, a mtDNS mintákat előinkubáltuk LL-37-tel. Komplexben az LL-37-tel, mind a natív, mind az oxidált formában levő mtDNS képes volt IFN- α termelést kiváltani a pDC-kben (**71. ábra**). Érdeemes megemlíteni, hogy a natív forma szignifikánsan több IFN- α -t indukált, mint az oxidált mtDNS, továbbá, a TLR9 antagonistával való előkezelés meggátolta ennek a mediátornak is mind a kétféle mtDNS formával történő indukcióját (**71. ábra**).



71. ábra. Az mtDNS-sel kezelt primer humán pDC-k IFN- α termelése

Primer humán pDC-ket kezeltünk csak natív, vagy oxidált mtDNS-sel (ox-mtDNS) önmagában, vagy katelicidinnel (LL-37), egy antimikrobiális peptiddel, komplexben, majd 24 órával később az IFN- α szintjét ELISA-val határoztuk meg a sejtek felülűszójában. Párhuzamos kísérletekben a pDC-ket specifikus TLR9 antagonistával (TTAGGG) inkubáltuk elő 1 órán át, majd ezután végeztük el kezeléseket. Az adatokat 3 független kísérlet átlaga $\pm$ SE formában ábrázoltuk. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs kezeletlen sejtek. N/D: nem kimutatható.

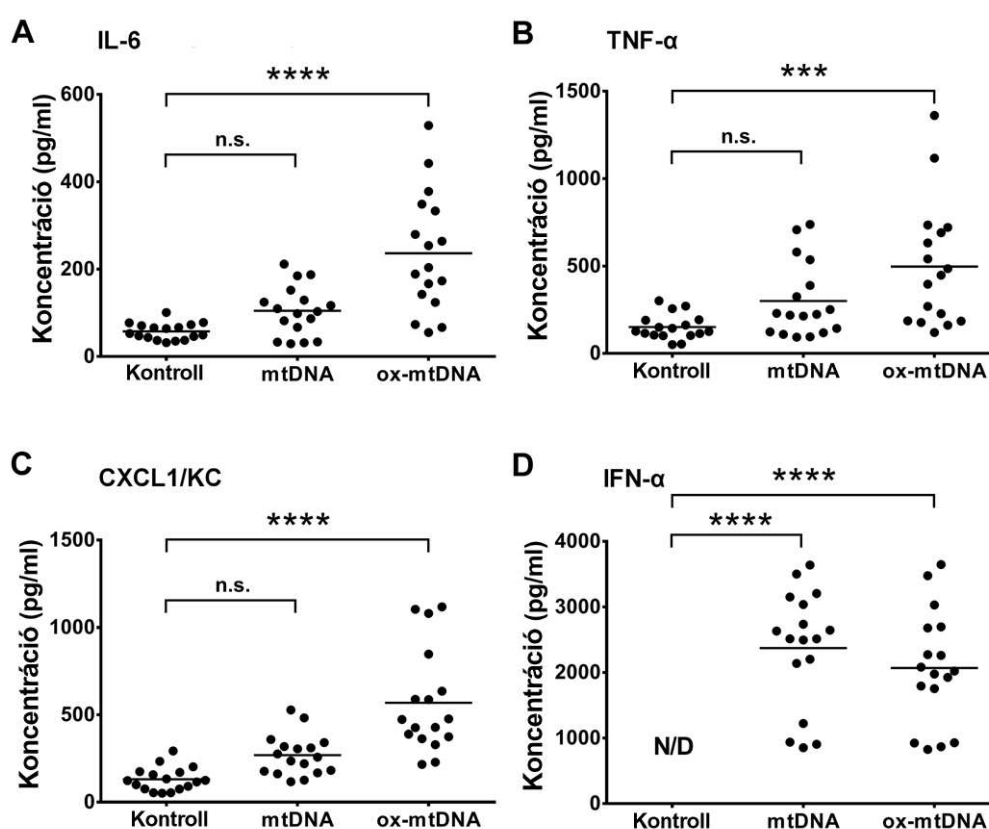
Annak tesztelésére, hogy az oxidált mtDNS *in vivo* körülmények között is hatékonyabb aktivátora-e a pDC-knek, mint a natív formája, mtDNS-t izoláltunk kezeletlen és Antimycin A-val kezelt egér SP2/0Ag14 sejtekből, majd intravénásan befecskendeztük 129Sv egerekbe. Korábbi megfigyelések szerint, az ösztrogének felerősítik a pDC-k immunválasz-készségét egerekben TLR7/TLR9 stimulációt követően [340]. Az erőteljesebb és így könnyebben detektálható mtDNS-indukált immunválaszok érdekében, csak nőstény állatokat használtunk a kísérleteinkben. A perifériális vérmintákat 6 órával a kezelés után gyűjtöttük össze, majd áramlási citometriás analízist végeztünk az egér pDC-k azonosítása és a fenotípusos változásaik meghatározása céljából. A natív mtDNS-sel történő *in vivo* kezelés megnövelte mind a CD86 kostimulációs (72. A ábra), mind az I-A/I-E antigén-prezentáló molekulák kifejeződését az egér pDC-ken, habár a változások statisztikailag csak az utóbbi esetben volt szignifikánsak. Az oxidált mtDNS intravénás befecskendezése fokozottabb növekedést eredményezett mind a két vizsgált marker kifejeződésében (72. A és B ábra), mint a natív formával történő kezelés.



72. ábra. Natív, vagy oxidált mtDNS-sel kezelt egerek véréből származó pDC-k fenotípusos analízise

A pDC-k *in vivo* stimulációjához nőstény 129Sv egereket oltottunk be intravénásan PBS oldattal (kontroll), natív vagy oxidált mtDNS-sel (ox-mtDNS). Minden kezelésnél az anyagokat DOTAP kationos-liposzómás transzfekciós reagenssel komplexben adtuk be. A kezelés után 6 órával perifériális vérmintákat vettünk, majd áramlási citometriás analízist végeztünk. Az egér pDC-keket, mint mPDCA-1⁺ sejteket kapuztuk, és az egér CD86 (A) valamint az I-A/I-E (B) molekulák kifejeződését az mPDCA-1⁺ populációban határoztuk meg. A relatív fluoreszcenciát a megfelelő izotípus-kontrollokra vonatkoztatva számoltuk ki mindegyik monoklonális Ab esetében. Az eredmények 4 független kísérletből származnak. $n = 13$). ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$ vs PBS-kezelt kontroll egerek.

A kezelt egerek szérumból meghatároztuk az IL-6, a TNF- α , a CXCL1/KC és az IFN- α mediátorok koncentrációját is ELISA módszerrel. Az oxidált mtDNS-sel oltott egerek szérumban statisztikailag szignifikánsan magasabb IL-6 (**73. A ábra**), TNF- α (**73. B ábra**), és CXCL1/KC (**73. C ábra**) szinteket mértünk, mint a kontroll egerek szérumban. Ezzel ellentétben, a natív mtDNS-sel oltott egerek szérumban elhanyagolható volt ezeknek a gyulladásos mediátorok szintjének az emelkedése (**73. A-C ábra**). A mtDNS mindkét formája jelentősen megnövelte az IFN- α szekrécióját *in vivo*, azonban az oxidált mtDNS kisebb mennyiségű IFN- α termelődését váltotta ki, mint a natív mtDNS (**73. D ábra**), hasonlóan az humán pDC-kkel kapott *in vitro* eredményeinkhez (**11.4. ábra**).



73. ábra. Citokin és kemokin szintek a natív, vagy oxidált mtDNS-sel kezelt egerek szérumaiban

A 129Sv egerek szérumaiból 6 órával a PBS oldattal (kontroll), natív, vagy oxidált mtDNS-sel (ox-mtDNS) történő oltás után határoztuk meg az IL-6 (A), a TNF- α (B), a CXCL1/KC (C), és az IFN- α (D) szinteket ELISA módszerrel. Az eredmények 4 független kísérletből származnak ($n=17$). *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ vs PBS-kezelt, kontroll egerek. N/D: nem kimutatható.

Munkánk során sikerült kimutatnunk, hogy a metilálatlan CpG szekvenciákat hordozó extracelluláris mtDNS képes aktiválni a humán pDC-ket. Eredményeink összhangban vannak azokkal a megfigyelésekkel, amelyek szerint az mtDNS kezelés fokozza a neutrofil granulociták aktivációját intracelluláris p38MAPK szignalizációs útvonalon keresztül [341], illetve pro-inflammatorikus citokin szekréciót vált ki monocita/makrofág eredetű sejtekből [342]. Kísérleteinket elvégeztük oxidatíván módosított mtDNS-sel is, mivel az extracelluláris térbe kerülő mtDNS-t a gyulladásos reakciók során a gyulladásos sejtek által termelt szabadgyökök oxidatíván módosíthatják. A DNS bázisok közül a guaninnak a legalacsonyabb a redox potenciálja, ezért ez a bázis a reaktív gyökök elsődleges célpontja, így nem meglepetés, hogy az oxidatíván károsodott mtDNS-ben megnövekedett 8-oxoG szintet detektáltunk. A keletkező 8-oxoG bázisokat az OGG1 enzim ismeri fel és vágja a ki a DNS-ből [34] [82.]. Az így keletkező szabad 8-oxoG bázisok vagy kiürülnek sejtekből [35], vagy az OGG1 enzimmel komplexet alkotva kis GTP-ázokat (Ras, Rac1, RhoA) képesek aktiválni [40-42]. Eredményeink azt mutatják, hogy a pDC-k megemelkedett 8-oxoG tartalmú mtDNS-sel történő kezelése a natív mtDNS kezelésekhez képest szignifikánsan erősebb aktivációt eredményez a pDC-k fenotípusos, illetve funkcionális válaszaiban. Úgy tűnik, hogy az oxidatív stressz eredményeként megjelenő 8-oxoG, akár az OGG1-gyel komplexet képezve, akár az mtDNS láncon belüli felhalmozódva, a gyulladásos folyamatok felerősödését tudja kiváltani.

6. KÖVETKEZTETÉSEK, HASZNOSÍTHATÓSÁG

Kísérleteink során sikerült kimutatnunk, hogy:

- A hidratálódott pollenszemek, a belőlük készített kivonatok és a szub-pollen részecskék NAD(P)H oxidáz aktivitással rendelkeznek. A pollen NAD(P)H oxidázok által termelt reaktív gyökök percekben belül oxidatív stresszt okoznak az egerek légútjaiban, függetlenül az adaptív immunválaszoktól.
- A pollen NAD(P)H oxidázok által generált oxidatív stressz fokozza a pollen allergén által kiváltott allergiás gyulladást a légutakban és a conjunctivában.
- Lokálisan alkalmazott antioxidánsok vagy laktoferrin képesek csökkenteni a pollen-eredetű oxidatív stressz mértékét a légutakban, így mérséklük az allergiás gyulladást.

Ezek a megfigyelések felvetik annak a lehetőségét, hogy olyan új antioxidánsok, vagy olyan új beviteli módjai az antioxidánsoknak, amelyek huzamosabb időn keresztül megnövelik a légutak teljes antioxidáns kapacitását, esetleg alkalmazhatók lennének a pollen eredetű allergiák terápiájában. Azonban nagyon sokféle betegségben próbáltak már antioxidánsokat alkalmazni a krónikus gyulladás velejárójaként kialakuló oxidatív stressz káros hatásainak kivédésére, sajnos nem sok sikerrel. Úgy tűnik ugyanis, hogy a szervezet redox-egyensúlya nem egyszerű mérlegként működik. Ha a fokozott ROS szintézis lenyomja a mérleg egyik serpenyőjét, nem elég a másik serpenyőbe csak antioxidánsokat tenni, hogy az egyensúly helyreálljon. Kis intenzitású oxidatív stressz jótékony hatású lehet a szervezet adaptációs mechanizmusainak aktiválásában. A nem megfelelő antioxidáns terápia kikapcsolhat ilyen – esetleg még kevésbé feltárt – szabályozó mechanizmusokat. Éppen ezért az a személyes véleményem, hogy talán járhatóbb lenne az az út, ha találnánk olyan gátlószert, amely specifikusan gátolja a pollen NAD(P)H oxidázokat, de nem befolyásolja a hasonló humán enzimeket működését.

- A környezeti oxidatív hatások által kiváltott mitokondriális károsodásnak a légutakban szerepe lehet a súlyos tünetekkel járó allergiás gyulladások kialakulásában.
- A 8-oxoG DNS-ből való kivágódásakor keletkező egyszálú DNS-törések felerősítik az allergiás légúti gyulladást.
- Kimutattuk, hogy mind a parlagfű pollenszemek, mind a szub-pollen részecskék - legalább részben - a NAD(P)H oxidázaik révén - képesek aktiválni a DC-ket.
- A gyulladásos sejtek által termelt oxigéngyökökkel reagáló pDC-knek a gyulladásokat csökkentő, illetve tolerogén hatása lehet az adaptív immunválasz során.

- Az extracelluláris, oxidált mitokondriális DNS erősebb immunmoduláló hatású, mint a natív változata.

Ez utóbbi megfigyelésünk is közvetlen felhasználási lehetőséggel kecsegtet. A már kifejlesztett, vagy még kifejlesztés alatt álló különböző DC-alapú vakcinák az antigének mellett adjuvánsokat is tartalmaznak a hatékonyabb adaptív immunválasz kiváltása érdekében. Az elmúlt években számos vakcinatípusban kipróbálták, hogy lehet-e a CpG DNS szekvenciákat adjuvánsként alkalmazni [343]. A CpG DNS motívumok a mintázatfelismerő receptorokon keresztül képesek aktiválni a hivatásos antigén-prezentáló sejteket, ezért hatékony adjuvánsnak bizonyultak mind az állatmodellekben, mind a klinikai tesztek során. Mivel kísérleteink során a magasabb 8-oxoG tartalmú, oxidált mtDNS hatékonyabb pDC aktivátornak bizonyult, mint a natív mtDNS, a továbbiakban meg fogjuk vizsgálni, hogy a szintetikus CpG szekvenciákban a guanin 8oxoG-ra való kicserélése fokozza-e az oligonukleotid adjuváns hatását.

Fontos megjegyeznem azt, hogy kísérleteinket állatmodellben, illetve izolált primer humán sejteken végeztük. Éppen ezért nem tudjuk megmondani, hogy megfigyeléseink milyen mértékben tükrözik az emberi szervezetben zajló biológia eseményeket. Egy most is zajló kísérletben azt vizsgáljuk, hogy van-e különbség az atópiás és a nem atópiás egyének között abból a szempontból, hogy a könnyükben és a szérumban működő antioxidáns rendszereik milyen hatékonysággal semlegesítik a pollen által termelt szabadgyököket. A vizsgálat lezárása után talán kicsit közelebb leszünk majd a fenti kérdés megválaszolásához.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként Dr. Boldogh István professzor úrnak, barátomnak és mentoromnak szeretném megköszönni, hogy többször is az elmúlt 15 év során együtt dolgozhattam vele a laboratóriumában (Dept. of Microbiology and Immunology, UTMB, Texas). Köszönöm, hogy bevezetett a reaktív gyökök rejtelmes világába, hálás vagyok, hogy folyamatosan egyengette a tudományos pályámat. Szeretnék köszönetet mondani a galvestoni munkacsoport minden korábbi és jelenlegi tagjának a kiváló kutatói légkör megteremtéséért, a hasznos szakmai beszélgetésekért, a sok baráti, önzetlen segítségért.

Hálás vagyok Rajnavölgyi Éva professzor asszonynak, a Debreceni Egyetem Immunológiai Intézet korábbi vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra az önálló laboratórium megteremtését. Nagyon sokat tanultam tőle a dendritikus sejtek biológiájáról, a csodálatos immunrendszer működéséről. Köszönöm, hogy mindig számíthattam bölcs tanácsaira, támogatására.

Köszönettel tartozom korábbi PhD hallgatóimnak: Pázmándi Kittinek, Csillag Anikónak, dr. Magyarics Zoltánnak és Hajas Györgynek. Külön köszönöm Pázmándi Kittinek, hogy a PhD cím elnyerése után a munkacsoportban maradt, és fáradhatatlan munkájával olyan sok terhet levesz a vállamról. Szeretném megköszönni a munkacsoport jelenlegi tagjainak: Varga Aliznak, Budai Mariettának és Sütő Máténak a kitartó lelkesedésüket. Köszönöm Orosz-Tóth Katalinnak a megbízható és áldozatos asszisztensi munkáját.

Hálásan köszönöm az Immunológiai Intézetben dolgozó minden munkatársamnak, hogy türelmükkel és megértésükkel támogatták a munkámat.

Nagyon köszönöm Bíró Tamás professzor úrnak, az Immunológiai Intézet igazgatójának, hogy támogatott az MTA doktori értekezésem elkészítésében.

Végül szeretnék köszönetet mondani a családomnak, feleségemnek, édesanyámnak és gyermekeimnek, valamint barátaimnak a szeretetükért és folyamatos támogatásukért.

8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK, TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

8.1. Az értekezést megalapozó *in extenso* közlemények (tematikus sorrendben)

1. Boldogh I, **Bacsi A**, Choudhury BK, Dharajiya N, Alam R, Hazra TK, Mitra S, Goldblum RM, Sur S. ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation.

JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 115:(8) pp. 2169-2179. (2005)

IF: 15.053

Istvan Boldogh, Attila Bacsi, Barun K. Choudhury, and Nilesh Dharajiya contributed equally to this work.

Független idéző: 149 Függő idéző: 42 Összesen: 191

2. **Bacsi A**, Dharajiya N, Choudhury BK, Sur S, Boldogh I. Effect of pollen-mediated oxidative stress on immediate hypersensitivity reactions and late- phase inflammation in allergic conjunctivitis.

JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY 116:(4) pp. 836-843. (2005)

IF: 7.667

Független idéző: 30 Függő idéző: 20 Összesen: 50

3. **Bacsi A**, Choudhury BK, Dharajiya N, Sur S, Boldogh I. Subpollen particles: carriers of allergenic proteins and oxidases.

JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY 118:(4) pp. 844-850. (2006)

IF: 8.829

Független idéző: 38 Függő idéző: 14 Összesen: 52

4. Dharajiya N, Choudhury BK, **Bacsi A**, Boldogh I, Alam R, Sur S. Inhibiting pollen reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-induced signal by intrapulmonary administration of antioxidants blocks allergic airway inflammation.

JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY 119:(3) pp. 646-653. (2007)

IF: 8.115

Független idéző: 32 Függő idéző: 9 Összesen: 41

5. Kruzel ML, **Bacsi A**, Choudhury B, Sur S, Boldogh I. Lactoferrin decreases pollen antigen-induced allergic airway inflammation in a murine model of asthma.

IMMUNOLOGY 119:(2) pp. 159-166. (2006)

IF: 3.674

Független idéző: 40 Függő idéző: 12 Összesen: 52

6. Aguilera-Aguirre L, **Bacsi A**, Saavedra-Molina A, Kurosky A, Sur S, Boldogh I. Mitochondrial dysfunction increases allergic airway inflammation.

JOURNAL OF IMMUNOLOGY 183:(8) pp. 5379-5387. (2009)

IF: 5.646

Független idéző: 55 Függő idéző: 13 Összesen: 68

7. **Bacsi A**, Aguilera-Aguirre L, Szczesny B, Radak Z, Hazra TK, Sur S, Ba X, Boldogh I. Down-regulation of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 expression in the airway epithelium ameliorates allergic lung inflammation.

DNA REPAIR 12:(1) pp. 18-26. (2013)

IF: 3.362

Független idéző: 8 Függő idéző: 11 Összesen: 19

8. Csillag A, Boldogh I, Pazmandi K, Magyarics Z, Gogolak P, Sur S, Rajnavolgyi E, **Bacsi A**. Pollen-Induced oxidative stress Influences both innate and adaptive immune responses via altering dendritic cell functions.

JOURNAL OF IMMUNOLOGY 184:(5) pp. 2377-2385. (2010)

IF: 5.745

Független idéző: 16 Függő idéző: 8 Összesen: 24

9. Pazmandi K, Kumar BV, Szabo K, Boldogh I, Szoor A, Vereb G, Veres A, Lanyi A, Rajnavolgyi E, **Bacsi A**. Ragweed subpollen particles of respirable size activate human dendritic cells.

PLOS ONE 7:(12) p. e52085. (2012)

IF: 3.730

Független idéző: 4 Függő idéző: 2 Összesen: 6

10. Pázmándi K, Magyarics Z, Boldogh I, Csillag A, Rajnavölgyi E, **Bácsi A**. Modulatory effects of low-dose hydrogen peroxide on the function of human plasmacytoid dendritic cells.

FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE 52:(3) pp. 635-645. (2012)

IF: 5.271

Független idéző: 1 Függő idéző: 1 Összesen: 2

11. Pázmándi K, Agod Zs, Kumar BV, Szabó A, Fekete T, Sógor V, Veres Á, Boldogh I, Rajnavölgyi É, Lányi Á, **Bácsi A**. Oxidative modification enhances the immunostimulatory effects of extracellular mitochondrial DNA on plasmacytoid dendritic cells.

FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE 77: pp. 281-290. (2014)

IF: 5.736

Független idéző: 2 Összesen: 2

8.2. Idegennyelvű közlemények a PhD fokozat megszerzése előtt

1. Beck Z, **Bacsi A**, Kovacs E, Kiss J, Kiss A, Balogh E, Telek B, Toth FD, Andirko I, Olah E, Udvardy M, Rak K. Changes in oncogene expression implicated in evolution of chronic granulocytic leukemia from its chronic phase to acceleration.

LEUKEMIA & LYMPHOMA 30:(3-4) pp. 293-306. (1998)

IF: 1.099

Független idéző: 15 Függő idéző: 2 Összesen: 17

2. Szabó J, **Bácsi A**, Andirkó I, Kiss J, Nemes J, D Tóth F. Reciprocal interactions between human cytomegalovirus and human T cell leukemia-lymphoma virus type I in monocyte-derived macrophages cultured in vitro.

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES 14: pp. 699-709. (1998)

IF: 2.609

Független idéző: 3 Függő idéző: 3 Összesen: 6

3. **Bacsi A**, Aranyosi J, Beck Z, Ebbesen P, Andirko I, Szabo J, Lampe L, Kiss J, Gergely L, D Toth F. Placental macrophage contact potentiates the complete replicative cycle of human cytomegalovirus in syncytiotrophoblast cells: role of interleukin-8 and transforming growth factor-beta1.

JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH 19: pp. 1153-1160. (1999)

IF: 2.171

Független idéző: 15 Összesen: 15

4. Szabó J, **Bácsi A**, Beck Z, Kiss J, Andirkó I, D Tóth F. Role of interleukin 8 and transforming growth factor- β 1 in enhancement of human cytomegalovirus replication by human T cell leukemia-lymphoma virus type I in macrophages coinfecting with both viruses. *JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH* 19: pp. 209-217. (1999)

IF: 2.171

Független idéző: 2 Összesen: 2

5. Szabó J, Beck Z, Csomán É, Liu X, Andirkó I, Kiss J, **Bácsi A**, Ebbesen P, D Tóth F. Differential patterns of interaction between HIV type I and HTLV type I monocyte-derived macrophages cultured in vitro: implications for in vivo coinfection with HIV type 1 and HTLV type I.

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES 15: pp. 1653-1666. (1999)

IF: 2.499

Független idéző: 9 Összesen: 9

6. Beck Z, Kiss A, D Tóth F, Szabó J, **Bácsi A**, Balogh E, Borbély Á, Telek B, Kovács E, Oláh É, Rák K. Alterations of p53 and Rb genes and evolution of the accelerated phase of chronic myeloid leukemia.

LEUKEMIA & LYMPHOMA 38: pp. 587-597. (2000)

IF: 1.252

Független idéző: 36 Függő idéző: 1 Összesen: 37

7. **Bácsi A**, Csoma E, Beck Z, Andirko I, Konya J, Gergely L, D Toth F. Induction of HIV-1 replication in latently infected syncytiotrophoblast cells by contact with placental macrophages: role of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α .

JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH 21: pp. 1079-1088. (2001)

IF: 2.281

Független idéző: 18 Függő idéző: 1 Összesen: 19

8. **Bácsi A**, Ebbesen P, Szabó J, Beck Z, Andirkó I, Csoma E, D Tóth F. Pseudotypes of vesicular stomatitis virus bearing envelope antigens of various HIV-1 strains permissively infect human syncytiotrophoblasts cultured in vitro.

JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 64: pp. 387-397. (2001)

IF: 2.881

Független idéző: 8 Függő idéző: 3 Összesen: 11

9. Horvath A, Banhegyi D, Biro A, Ujhelyi E, Veres A, Horvath L, Prohaszka Z, **Bácsi A**, Tarjan V, Romics L, Horvath I, Toth F D, Fust G, Karadi I. High level of anticholesterol antibodies (ACHA) in HIV patients. Normalization of serum ACHA concentration after introduction of HAART

IMMUNOBIOLOGY 203:(5) pp. 756-768. (2001)

IF: 1.648

Független idéző: 7 Függő idéző: 3 Összesen: 10

10. Szabó J, Cervenák L, Tóth FD, Prohászka Z, Horváth L, Kerekes K, Beck Z, **Bácsi A**, Erdei A, Peerschke EIB, Füst G, Ghebrehiwet B. Soluble gC1q-R/p33, a Cell Protein That Binds to the Globular "Heads" of C1q Effectively Inhibits the Growth of HIV-1 Strains In Cell Cultures.

CLINICAL IMMUNOLOGY 99:(2) pp. 222-231. (2001)

IF: 2.760

Független idéző: 5 Függő idéző: 2 Összesen: 7

11. D Tóth F, **Bácsi A**, Beck Z, Szabó J. Vertical transmission of human immunodeficiency virus (A review)
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 48: pp. 413-427. (2001)
 Független idéző: 1 Összesen: 1

8.3. A PhD fokozat megszerzése óta megjelent további idegennyelvű közlemények

1. Csoma E, **Bácsi A**, Liu X, Szabó J, Ebbesen P, Beck Z, Kónya J, Andirkó I, Nagy E, D. Tóth F. Human herpesvirus 6 variant A infects human term syncytiotrophoblasts in vitro and induces replication of human immunodeficiency virus type 1 in dually infected cells.
JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 67: pp. 67-87. (2002)
 IF: 2.629
 Független idéző: 16 Összesen: 16

2. Banhegyi D, **Bacsi A**, Toth FD, Prohaszka Z, Horvath A, Beck Z, Konya J, Fust G. Significant decrease of the enhancement/neutralization index in HIV patients during highly active antiretroviral therapy (HAART).
IMMUNOLOGY LETTERS 89:(1) pp. 25-30. (2003)
 IF: 1.710
 Független idéző: 4 Függő idéző: 2 Összesen: 6

3. Beck Z, **Bácsi A**, Liu X, Ebbesen P, Andirkó I, Csoma E, Kónya J, Nagy E, Tóth FD. Differential patterns of Human Cytomeglaovirus gene expression in Various T-cell lines carrying human T-cell leukemia-lymphoma virus Type I: role of Tax-activated cellular transcription factors.
JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 71: pp. 94-104. (2003)
 IF: 2.371
 Független idéző: 4 Összesen: 4

4. Boldogh I, Roy G, Lee MS, **Bacsi A**, Hazra TK, Bhakat KK, Das GC, Mitra S. Reduced DNA double strand breaks in chlorambucil resistant cells are related to high DNA- PKcs activity and low oxidative stress.
TOXICOLOGY 193:(1-2) pp. 137-152. (2003)
 IF: 2.061
 Független idéző: 32 Függő idéző: 13 Összesen: 45

5. **Bacsi A**, Stanton GJ, Hughes TK, Kruze M, Boldogh I. Colostrinin-driven neurite outgrowth requires p53 activation in PC12 cells.
CELLULAR AND MOLECULAR NEUROBIOLOGY 25:(7) pp. 1123-1139. (2005)
 IF: 2.022
 Független idéző: 20 Függő idéző: 8 Összesen: 28

6. **Bacsi A**, Kannan S, Lee MS, Hazra TK, Boldogh I. Modulation of DNA-dependent protein kinase activity in chlorambucil-treated cells.
FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE 39:(12) pp. 1650-1659. (2005)
 IF: 4.971
 Független idéző: 15 Függő idéző: 3 Összesen: 18

7. **Bacsi A**, Aguilera-Aguirre L, German P, Kruzel ML, Boldogh I. Colostrinin decreases spontaneous and induced mutation frequencies at the hprt locus in Chinese hamster V79 cells.

JOURNAL OF EXPERIMENTAL THERAPEUTICS AND ONCOLOGY 5:(4) pp. 249-259. (2006)

Független idéző: 6 Függő idéző: 4 Összesen: 10

8. **Bacsi A**, Woodberry M, Widger W, Papaconstantinou J, Mitra S, Peterson JW, Boldogh I. Localization of superoxide anion production to mitochondrial electron transport chain in 3-NPA-treated cells.

MITOCHONDRION 6:(5) pp. 235-244. (2006)

IF: 2.191

Független idéző: 23 Függő idéző: 9 Összesen: 32

9. Das GC, **Bacsi A**, Shrivastav M, Hazra TK, Boldogh I. Enhanced gamma-glutamylcysteine synthetase activity decreases drug-induced oxidative stress levels and cytotoxicity.

MOLECULAR CARCINOGENESIS 45:(9) pp. 635-647. (2006)

IF: 2.743

Független idéző: 18 Függő idéző: 2 Összesen: 20

10. **Bacsi A**, Woodberry M, Kruzel ML, Boldogh I. Colostrinin delays the onset of proliferative senescence of diploid murine fibroblast cells.

NEUROPEPTIDES 41:(2) pp. 93-101. (2007)

IF: 2.492

Független idéző: 11 Függő idéző: 5 Összesen: 16

11. **Bacsi A**, Chodaczek G, Hazra TK, Konkel D, Boldogh I. Increased ROS generation in subsets of OGG1 knockout fibroblast cells.

MECHANISMS OF AGEING AND DEVELOPMENT 128:(11-12) pp. 637-649. (2007)

IF: 4.308

Független idéző: 14 Függő idéző: 10 Összesen: 24

12. Dharajiya NG, **Bacsi A**, Boldogh I, Sur S. Pollen NAD(P)H oxidases and their contribution to allergic inflammation (A review).

IMMUNOLOGY AND ALLERGY CLINICS OF NORTH AMERICA 27:(1) pp. 45-63. (2007)

IF: 2.347

Független idéző: 4 Függő idéző: 2 Összesen: 6

13. Chodaczek G, Saavedra-Molina A, **Bacsi A**, Kruzel ML, Sur S, Boldogh I. Iron-mediated dismutation of superoxide anion augments antigen-induced allergic inflammation: effect of lactoferrin.

POSTEPI HIGIENY I MEDYCZNY DOSWIADCZALNEJ 61: pp. 268-276. (2007)

Független idéző: 12 Függő idéző: 7 Összesen: 19

14. Boldogh I, Aguilera-Aguirre L, **Bacsi A**, Choudhury BK, Saavedra-Molina A, Kruzel M. Colostrinin decreases hypersensitivity and allergic responses to common allergens.

INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY 146:(4) pp. 298-306. (2008)

IF: 2.131

Független idéző: 6 Függő idéző: 5 Összesen: 11

15. Magyarics Z, Csillag A, Pazmandi K, Rajnavolgyi E, **Bacsi A**. Identification of plasmacytoid pre-dendritic cells by one-color flow cytometry for phenotype screening.

CYTOMETRY PART A 73A:(3) pp. 254-258. (2008)

IF: 3.259

Független idéző: 6 Függő idéző: 3 Összesen: 9

16. Chodaczek G, **Bacsi A**, Dharajiya N, Sur S, Hazra TK, Boldogh I. Ragweed pollen-mediated IgE-independent release of biogenic amines from mast cells via induction of mitochondrial dysfunction.

MOLECULAR IMMUNOLOGY 46:(13) pp. 2505-2514. (2009)

IF: 3.202

Független idéző: 17 Függő idéző: 6 Összesen: 23

17. Woodberry MW, Aguilera-Aguirre L, **Bacsi A**, Chopra AK, Kurosky A, Peterson JW, Boldogh I. ATP depletion via mitochondrial F₁F₀ complex by lethal factor is an early event in B. anthracis-induced sudden cell death.

JOURNAL OF CELL DEATH 2009: pp. 25-39. (2009)

Független idéző: 2 Összesen: 2

18. Kruzel M L, Actor J K, Radak Z, **Bacsi A**, Saavedra-Molina A, Boldogh I. Lactoferrin decreases LPS-induced mitochondrial dysfunction in cultured cells and in animal endotoxemia model.

INNATE IMMUNITY 16:(2) pp. 67-79. (2010)

IF: 3.283

Független idéző: 24 Függő idéző: 2 Összesen: 26

19. Boldogh I, Hajas G, Aguilera-Aguirre L, Hegde M L, Radak Z, **Bacsi A**, Sur S, Hazra T K, Mitra S. Activation of Ras signaling pathway by 8-oxoguanine DNA glycosylase bound to its excision product, 8-oxoguanine.

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 287:(25) pp. 20769-20773. (2012)

IF: 4.651

Független idéző: 23 Függő idéző: 20 Összesen: 43

20. Hajas G, **Bacsi A**, Aguilera-Aguirre L, German P, Radak Z, Sur S, Hazra TK, Boldogh I. Biochemical identification of a hydroperoxide derivative of the free 8-oxo-7,8-dihydroguanine base.

FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE 52:(4) pp. 749-756. (2012)

IF: 5.271

Független idéző: 3 Függő idéző: 4 Összesen: 7

21. Murai H, Qi H, Choudhury B, Wild J, Dharajiya N, Vaidya S, Kalita A, **Bacsi A**, Corry D, Kurosky A, Brasier A, Boldogh I, Sur S. Alternaria-induced release of IL-18 from damaged airway epithelial cells: an NF- κ B dependent mechanism of Th2 differentiation?

PLOS ONE 7:(2) p. e30280. (2012)

IF: 3.730

Független idéző: 6 Függő idéző: 1 Összesen: 7

22. Vida A, Bardoel B, Milder F, Majoros L, Sümegi A, **Bácsi A**, Vereb G, van Kessel KP, van Strijp JA, Antal-Szalmás P. Fusion of the Fc part of human IgG1 to CD14 enhances its binding to gram-negative bacteria and mediates phagocytosis by Fc receptors of neutrophils.

IMMUNOLOGY LETTERS 146:(1-2) pp. 31-39. (2012)

IF: 2.337

Független idéző: 4 Összesen: 4

23. German P, Szaniszló P, Hajas G, Radak Z, **Bacsi A**, Hazra TK, Hegde ML, Ba X, Boldogh I. Activation of cellular signaling by 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-initiated DNA base excision repair.

DNA REPAIR 12:(10) pp. 856-863. (2013)

IF: 3.362

Független idéző: 11 Függő idéző: 10 Összesen: 21

24. Hajas G, **Bacsi A**, Aguilera-Aguirre L, Hegde ML, Tapas K H, Sur S, Radak Z, Ba X, Boldogh I. 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1 links DNA repair to cellular signaling via the activation of the small GTPase Rac1.

FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE 61: pp. 384-394. (2013)

IF: 5.710

Független idéző: 16 Függő idéző: 11 Összesen: 27

25. Szabó A, Gogolák P, Pázmándi K, Kis-Tóth K, Riedl K, Wizel B, Lingnau K, **Bácsi A**, Réthi B, Rajnavölgyi É. The Two-Component Adjuvant IC31(R) Boosts Type I Interferon Production of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells via Ligation of Endosomal TLRs.

PLOS ONE 8:(2) Paper e55264. 13 p. (2013)

IF: 3.534

Független idéző: 7 Függő idéző: 1 Összesen: 8

26. Varga A, Budai MM, Milesz S, **Bácsi A**, Tózsér J, Benko S. Ragweed pollen extract intensifies lipopolysaccharide-induced priming of NLRP3 inflammasome in human macrophages.

IMMUNOLOGY 138:(4) pp. 392-401. (2013)

IF: 3.735

Független idéző: 4 Összesen: 4

27. Aguilera-Aguirre L, **Bácsi A**, Radák Z, Hazra TK, Mitra S, Sur S, Brasier AR, Ba X, Boldogh I. Innate Inflammation Induced by the 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1-KRAS-NF- κ B Pathway.

JOURNAL OF IMMUNOLOGY 193:(9) pp. 4643-4653. (2014)

IF: 4.922

Független idéző: 5 Függő idéző: 7 Összesen: 12

28. Ba X, **Bacsi A**, Luo J, Aguilera-Aguirre L, Zeng X, Radak Z, Brasier AR, Boldogh I. 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 augments proinflammatory gene expression by facilitating the recruitment of site-specific transcription factors.

JOURNAL OF IMMUNOLOGY 192:(5) pp. 2384-2394. (2014)

IF: 4.922

Független idéző: 7 Függő idéző: 6 Összesen: 13

29. Csillag A, Kumar BV, Szabo K, Szilasi M, Papp Z, Szilasi ME, Pazmandi K, Boldogh I, Rajnavölgyi E, **Bacsi A**, Laszlo JF. Exposure to inhomogeneous static magnetic field beneficially affects allergic inflammation in a murine model.

JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY INTERFACE 11:(95) Paper 20140097. (2014)

IF: 3.917

Attila Bácsi and János F. László contributed equally to this study.

Független idéző: 1 Függő idéző: 1 Összesen: 2

30. Dozsa A, Dezso B, Toth BI, **Bacsi A**, Poliska S, Camera E, Picardo M, Zouboulis CC, Biro T, Schmitz G, Liebisch G, Ruhl R, Remenyik E, Nagy L. PPARgamma-Mediated and Arachidonic Acid-Dependent Signaling is Involved in Differentiation and Lipid Production of Human Sebocytes.

JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY 134:(4) pp. 910-920. (2014)

IF: 7.216

Független idéző: 5 Függő idéző: 5 Összesen: 10

31. Fekete T, Pazmandi K, Szabo A, **Bacsi A**, Koncz G, Rajnavolgyi E. The antiviral immune response in human conventional dendritic cells is controlled by the mammalian target of rapamycin.

JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY 96:(4) pp. 579-589. (2014)

IF: 4.289

Független idéző: 2 Összesen: 2

32. Luo J, Hosoki K, **Bacsi A**, Radak Z, Hegde ML, Sur S, Hazra TK, Brasier AR, Ba X, Boldogh I. 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated DNA repair is associated with Rho GTPase activation and α -smooth muscle actin polymerization.

FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE 73: pp. 430-438. (2014)

IF: 5.736

Független idéző: 5 Függő idéző: 5 Összesen: 10

33. Ba X, Aguilera-Aguirre L, Rashid QT, Bácsi A, Radák Z, Sur S, Hosoki K, Hegde ML, Boldogh I. The Role of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1 in Inflammation (A review).

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 15:(9) pp. 16975-16997. (2014)

IF: 2.862

Független idéző: 5 Függő idéző: 6 Összesen: 11

34. Szabo A, Magyarics Z, Pazmandi K, Gopcsa L, Rajnavolgyi E, **Bacsi A**. TLR ligands upregulate RIG-I expression in human plasmacytoid dendritic cells in a type I IFN-independent manner.

IMMUNOLOGY AND CELL BIOLOGY 92:(8) pp. 671-678. (2014)

IF: 4.147

Független idéző: 5 Összesen: 5

35. Aguilera-Aguirre L, Hosoki K, **Bacsi A**, Radak Z, Wood TG, Widen SG, Sur S, Ameredes BT, Saavedra-Molina A, Brasier AR, Ba X, Boldogh I. Whole transcriptome analysis reveals an 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-driven DNA repair-dependent gene expression linked to essential biological processes.

FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE 81: pp. 107-118. (2015)

IF: 5.736*

Független idéző: 4 Függő idéző: 2 Összesen: 6

36. Aguilera-Aguirre L, Hosoki K, **Bacsi A**, Radák Z, Sur S, Hegde ML, Tian B, Saavedra-Molina A, Brasier AR, Ba X, Boldogh I. Whole transcriptome analysis reveals a role for OGG1-initiated DNA repair signaling in airway remodeling.

FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE 89: pp. 20-33. (2015)

IF: 5.736*

Függő idéző: 1 Összesen: 1

37. **Bacsi A**, Pan L, Ba X, Boldogh I. Pathophysiology of bronchoconstriction: role of oxidatively damaged DNA repair

CURRENT OPINION IN ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY 16:(1) pp. 59-67. (2016)

IF: 3.574**

38. Polonkai E, Gyimesi E, Kovács I, Csillag A, Balla G, Rajnavölgyi É, **Bácsi A**, Sipka S. A possible role of elevated breast milk lactoferrin and the cytokine IL-17 levels in predicting early allergy in infants: A pilot study.

ACTA ALIMENTARIA 45:(2) pp. 157-162. (2016)

IF: 0.274**

39. Szabo A, Fekete T, Koncz G, Kumar BV, Pazmandi K, Foldvari Z, Hegedus B, Garay T, **Bacsi A**, Rajnavolgyi E, Lanyi A. RIG-I inhibits the MAPK-dependent proliferation of BRAF mutant melanoma cells via MKP-1. *CELLULAR SIGNALLING* 28:(5) pp. 335-347. (2016)
IF: 4.315**

8.4. Tudománymetriai adatok

In extenso közlemények száma	61
magyar nyelven:	-
angol nyelven:	61
In extenso közlemények száma a PhD előtt:	11
In extenso közlemények száma a PhD után:	50
In extenso első szerzős közlemények száma:	14
In extenso utolsó szerzős közlemények száma:	7
Összesített impakt faktor:	IF: 225,9
Független hivatkozások száma:	843
Könyvfejezetek száma:	1
Felsőoktatási tankönyvfejezet:	4
Hirsch-index:	19

9. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Galli, F., et al., *Oxidative stress and reactive oxygen species*. Contrib Nephrol, 2005. **149**: p. 240-60.
2. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 239-47.
3. Boveris, A., N. Oshino, and B. Chance, *The cellular production of hydrogen peroxide*. Biochem J, 1972. **128**(3): p. 617-30.
4. Jezek, P. and L. Hlavata, *Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(12): p. 2478-503.
5. Bacsi, A., et al., *Localization of superoxide anion production to mitochondrial electron transport chain in 3-NPA-treated cells*. Mitochondrion, 2006. **6**(5): p. 235-44.
6. Tyler, D.D., *Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver*. Biochem J, 1975. **147**(3): p. 493-504.
7. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. **59**(3): p. 527-605.
8. Schroedl, C., et al., *Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(5): p. L922-31.
9. Geiszt, M., *NADPH oxidases: new kids on the block*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 289-99.
10. Babior, B.M., *NADPH oxidase: an update*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1464-76.
11. Segal, A.W. and K.P. Shatwell, *The NADPH oxidase of phagocytic leukocytes*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **832**: p. 215-22.
12. Geiszt, M. and T.L. Leto, *The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 51715-8.
13. Sirokmany, G., A. Donko, and M. Geiszt, *Nox/Duox Family of NADPH Oxidases: Lessons from Knockout Mouse Models*. Trends Pharmacol Sci, 2016. **37**(4): p. 318-27.
14. Bae, Y.S., et al., *Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling*. Mol Cells, 2011. **32**(6): p. 491-509.
15. Tolbert, N.E. and E. Essner, *Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes*. J Cell Biol, 1981. **91**(3 Pt 2): p. 271s-283s.
16. Fridovich, I., *Superoxide radical and superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 97-112.
17. Devasagayam, T.P., et al., *Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects*. J Assoc Physicians India, 2004. **52**: p. 794-804.
18. Ajuwon, O.R., J.L. Marnewick, and L.M. Davids, *Rooibos (Aspalathus linearis) and its Major Flavonoids — Potential Against Oxidative Stress-Induced Conditions*, in *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*, S.J.T. Gowder, Editor. 2015, InTech.
19. Sadowska, A.M., Y.K.B. Manuel, and W.A. De Backer, *Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant in vitro and in vivo dose-effects: a review*. Pulm Pharmacol Ther, 2007. **20**(1): p. 9-22.
20. Pisoschi, A.M. and A. Pop, *The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*. Eur J Med Chem, 2015. **97**: p. 55-74.
21. Freeman, B.A. and J.D. Crapo, *Biology of disease: free radicals and tissue injury*. Lab Invest, 1982. **47**(5): p. 412-26.
22. Uchida, K., *4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress*. Prog Lipid Res, 2003. **42**(4): p. 318-43.
23. Dalle-Donne, I., et al., *Biomarkers of oxidative damage in human disease*. Clin Chem, 2006. **52**(4): p. 601-23.
24. Fruhwirth, G.O., A. Loidl, and A. Hermetter, *Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(7): p. 718-36.

25. Ayala, A., M.F. Munoz, and S. Arguelles, *Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal*. *Oxid Med Cell Longev*, 2014. **2014**: p. 360438.
26. Khansari, N., Y. Shakiba, and M. Mahmoudi, *Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer*. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2009. **3**(1): p. 73-80.
27. Pandey, K.B. and S.I. Rizvi, *Biomarkers of oxidative stress in red blood cells*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2011. **155**(2): p. 131-6.
28. Butterfield, D.A. and I. Dalle-Donne, *Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and disease*. *Mass Spectrom Rev*, 2014. **33**(1): p. 1-6.
29. Halliwell, B. and M. Whiteman, *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?* *Br J Pharmacol*, 2004. **142**(2): p. 231-55.
30. Cecarini, V., et al., *Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1773**(2): p. 93-104.
31. Avery, S.V., *Molecular targets of oxidative stress*. *Biochem J*, 2011. **434**(2): p. 201-10.
32. Chan, S.W. and P.C. Dedon, *The biological and metabolic fates of endogenous DNA damage products*. *J Nucleic Acids*, 2010. **2010**: p. 929047.
33. Lindahl, T. and D.E. Barnes, *Repair of endogenous DNA damage*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2000. **65**: p. 127-33.
34. Dizdaroglu, M., *Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases*. *Mutat Res*, 2005. **591**(1-2): p. 45-59.
35. Svoboda, P., et al., *Urinary 8-hydroxyguanine may be a better marker of oxidative stress than 8-hydroxydeoxyguanosine in relation to the life spans of various species*. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(5-6): p. 985-92.
36. Nishimura, S., *Involvement of mammalian OGG1(MMH) in excision of the 8-hydroxyguanine residue in DNA*. *Free Radic Biol Med*, 2002. **32**(9): p. 813-21.
37. Arai, T., et al., *The study using wild-type and Ogg1 knockout mice exposed to potassium bromate shows no tumor induction despite an extensive accumulation of 8-hydroxyguanine in kidney DNA*. *Toxicology*, 2006. **221**(2-3): p. 179-86.
38. Touati, E., et al., *Deficiency in OGG1 protects against inflammation and mutagenic effects associated with H. pylori infection in mouse*. *Helicobacter*, 2006. **11**(5): p. 494-505.
39. Mabley, J.G., et al., *Potential role for 8-oxoguanine DNA glycosylase in regulating inflammation*. *Faseb J*, 2005. **19**(2): p. 290-2.
40. Boldogh, I., et al., *Activation of ras signaling pathway by 8-oxoguanine DNA glycosylase bound to its excision product, 8-oxoguanine*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(25): p. 20769-73.
41. Hajas, G., et al., *8-Oxoguanine DNA glycosylase-1 links DNA repair to cellular signaling via the activation of the small GTPase Rac1*. *Free Radic Biol Med*, 2013. **61**: p. 384-94.
42. Luo, J., et al., *8-Oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated DNA repair is associated with Rho GTPase activation and alpha-smooth muscle actin polymerization*. *Free Radic Biol Med*, 2014. **73**: p. 430-8.
43. Ba, X., et al., *8-Oxoguanine DNA glycosylase-1-driven DNA base excision repair: role in asthma pathogenesis*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2015. **15**(1): p. 89-97.
44. Murphy, M.P., et al., *Unraveling the biological roles of reactive oxygen species*. *Cell Metab*, 2011. **13**(4): p. 361-6.
45. Gough, D.R. and T.G. Cotter, *Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule*. *Cell Death Dis*, 2011. **2**: p. e213.
46. Li, N. and A.E. Nel, *Role of the Nrf2-mediated signaling pathway as a negative regulator of inflammation: implications for the impact of particulate pollutants on asthma*. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(1-2): p. 88-98.

47. Inai, Y., et al., *Oxygen-dependent-regulation of Ehrlich ascites tumor cell respiration by nitric oxide*. Cell Struct Funct, 1996. **21**(2): p. 151-7.
48. Finkel, T., *Oxygen radicals and signaling*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(2): p. 248-53.
49. Rhee, S.G., *Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger*. Exp Mol Med, 1999. **31**(2): p. 53-9.
50. Greene, L.S., *Asthma and oxidant stress: nutritional, environmental, and genetic risk factors*. J Am Coll Nutr, 1995. **14**(4): p. 317-24.
51. Reddy, P.H., *Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Asthma: Implications for Mitochondria-Targeted Antioxidant Therapeutics*. Pharmaceuticals (Basel), 2011. **4**(3): p. 429-456.
52. MacPherson, J.C., et al., *Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5763-72.
53. Wu, W., et al., *Eosinophils generate brominating oxidants in allergen-induced asthma*. J Clin Invest, 2000. **105**(10): p. 1455-63.
54. van Dalen, C.J., C.C. Winterbourn, and A.J. Kettle, *Mechanism of nitrite oxidation by eosinophil peroxidase: implications for oxidant production and nitration by eosinophils*. Biochem J, 2006. **394**(Pt 3): p. 707-13.
55. Chen, H.J. and W.L. Chiu, *Simultaneous detection and quantification of 3-nitrotyrosine and 3-bromotyrosine in human urine by stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Toxicol Lett, 2008. **181**(1): p. 31-9.
56. Ghosh, S., et al., *Nitrotyrosine proteome survey in asthma identifies oxidative mechanism of catalase inactivation*. J Immunol, 2006. **176**(9): p. 5587-97.
57. Peden, D.B., et al., *Prolonged acute exposure to 0.16 ppm ozone induces eosinophilic airway inflammation in asthmatic subjects with allergies*. J Allergy Clin Immunol, 1997. **100**(6 Pt 1): p. 802-8.
58. Squadrito, G.L., et al., *Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(9): p. 1132-8.
59. Quay, J.L., et al., *Air pollution particles induce IL-6 gene expression in human airway epithelial cells via NF-kappaB activation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **19**(1): p. 98-106.
60. McCreanor, J., et al., *Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma*. N Engl J Med, 2007. **357**(23): p. 2348-58.
61. Seagrave, J., *Oxidative mechanisms in tobacco smoke-induced emphysema*. J Toxicol Environ Health A, 2000. **61**(1): p. 69-78.
62. Sutherland, E.R., et al., *Cluster analysis of obesity and asthma phenotypes*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36631.
63. Shore, S.A., et al., *Effect of leptin on allergic airway responses in mice*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(1): p. 103-9.
64. Holguin, F., et al., *Airway and plasma leptin and adiponectin in lean and obese asthmatics and controls*. J Asthma, 2011. **48**(3): p. 217-23.
65. Lugogo, N.L., et al., *Alveolar macrophages from overweight/obese subjects with asthma demonstrate a proinflammatory phenotype*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **186**(5): p. 404-11.
66. Wood, L.G., M.L. Garg, and P.G. Gibson, *A high-fat challenge increases airway inflammation and impairs bronchodilator recovery in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(5): p. 1133-40.
67. Wells, S.M. and A. Holian, *Asymmetric dimethylarginine induces oxidative and nitrosative stress in murine lung epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **36**(5): p. 520-8.
68. Tran, C.T., J.M. Leiper, and P. Vallance, *The DDAH/ADMA/NOS pathway*. Atheroscler Suppl, 2003. **4**(4): p. 33-40.
69. Lara, A., et al., *Alterations of the arginine metabolome in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(7): p. 673-81.

70. Palomo, I., et al., *Elevated concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in individuals with metabolic syndrome*. Nitric Oxide, 2011. **24**(4): p. 224-8.
71. Holguin, F., et al., *An association between L-arginine/asymmetric dimethyl arginine balance, obesity, and the age of asthma onset phenotype*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **187**(2): p. 153-9.
72. Shortman, K. and P. Sathe, *Another heritage for plasmacytoid dendritic cells*. Immunity, 2013. **38**(5): p. 845-6.
73. Shortman, K., et al., *Plasmacytoid dendritic cell development*. Adv Immunol, 2013. **120**: p. 105-26.
74. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 19-30.
75. GeurtsvanKessel, C.H., et al., *Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1621-34.
76. Segura, E., et al., *Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation*. Immunity, 2013. **38**(2): p. 336-48.
77. Jakob, T. and M.C. Udey, *Regulation of E-cadherin-mediated adhesion in Langerhans cell-like dendritic cells by inflammatory mediators that mobilize Langerhans cells in vivo*. J Immunol, 1998. **160**(8): p. 4067-73.
78. Sung, S.S., et al., *A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins*. J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2161-72.
79. Guilleams, M., B.N. Lambrecht, and H. Hammad, *Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(3): p. 464-73.
80. Takano, K., et al., *HLA-DR- and CD11c-positive dendritic cells penetrate beyond well-developed epithelial tight junctions in human nasal mucosa of allergic rhinitis*. J Histochem Cytochem, 2005. **53**(5): p. 611-9.
81. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma*. Immunity, 2009. **31**(3): p. 412-24.
82. del Rio, M.L., et al., *CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6861-6.
83. Allan, R.S., et al., *Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming*. Immunity, 2006. **25**(1): p. 153-62.
84. Belz, G.T., et al., *Minimal activation of memory CD8+ T cell by tissue-derived dendritic cells favors the stimulation of naive CD8+ T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(10): p. 1060-6.
85. Carbone, F.R., G.T. Belz, and W.R. Heath, *Transfer of antigen between migrating and lymph node-resident DCs in peripheral T-cell tolerance and immunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 655-8.
86. Belz, G.T., et al., *Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(23): p. 8670-5.
87. Hildner, K., et al., *Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity*. Science, 2008. **322**(5904): p. 1097-100.
88. Edelson, B.T., et al., *Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells*. J Exp Med, 2010. **207**(4): p. 823-36.
89. Khare, A., et al., *Cutting edge: inhaled antigen upregulates retinaldehyde dehydrogenase in lung CD103+ but not plasmacytoid dendritic cells to induce Foxp3 de novo in CD4+ T cells and promote airway tolerance*. J Immunol, 2013. **191**(1): p. 25-9.

90. Masten, B.J., et al., *Flt3 ligand preferentially increases the number of functionally active myeloid dendritic cells in the lungs of mice*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4077-83.
91. von Garnier, C., et al., *Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract*. J Immunol, 2005. **175**(3): p. 1609-18.
92. Ginhoux, F., et al., *Langerhans cells arise from monocytes in vivo*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 265-73.
93. Beaty, S.R., C.E. Rose, Jr., and S.S. Sung, *Diverse and potent chemokine production by lung CD11b^{high} dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation*. J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1882-95.
94. Plantinga, M., et al., *Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen*. Immunity, 2013. **38**(2): p. 322-35.
95. Donnenberg, V.S. and A.D. Donnenberg, *Identification, rare-event detection and analysis of dendritic cell subsets in broncho-alveolar lavage fluid and peripheral blood by flow cytometry*. Front Biosci, 2003. **8**: p. s1175-80.
96. Schon-Hegrad, M.A., et al., *Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airways*. J Exp Med, 1991. **173**(6): p. 1345-56.
97. Sertl, K., et al., *Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura*. J Exp Med, 1986. **163**(2): p. 436-51.
98. Demedts, I.K., et al., *Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(3): p. 177-84.
99. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6037-46.
100. Bratke, K., et al., *Dendritic cell subsets in human bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge*. Thorax, 2007. **62**(2): p. 168-75.
101. Van Pottelberge, G.R., et al., *Selective accumulation of langerhans-type dendritic cells in small airways of patients with COPD*. Respir Res, 2010. **11**: p. 35.
102. Collin, M., N. McGovern, and M. Haniffa, *Human dendritic cell subsets*. Immunology, 2013. **140**(1): p. 22-30.
103. Mildner, A. and S. Jung, *Development and function of dendritic cell subsets*. Immunity, 2014. **40**(5): p. 642-56.
104. Lloyd, C.M. and E.M. Hessel, *Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 838-48.
105. Schuijs, M.J., et al., *Cytokine targets in airway inflammation*. Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(3): p. 351-61.
106. Barlow, J.L., et al., *Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(1): p. 191-8 e1-4.
107. Halim, T.Y., et al., *Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation*. Immunity, 2012. **36**(3): p. 451-63.
108. Klein Wolterink, R.G., et al., *Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma*. Eur J Immunol, 2012. **42**(5): p. 1106-16.
109. Kerzerho, J., et al., *Programmed cell death ligand 2 regulates TH9 differentiation and induction of chronic airway hyperreactivity*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **131**(4): p. 1048-57, 1057 e1-2.
110. Wilhelm, C., et al., *An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation*. Nat Immunol, 2011. **12**(11): p. 1071-7.

111. Zhao, J., C.M. Lloyd, and A. Noble, *Th17 responses in chronic allergic airway inflammation abrogate regulatory T-cell-mediated tolerance and contribute to airway remodeling*. *Mucosal Immunol*, 2012. **6**(2): p. 335-46.
112. Hammad, H., et al., *Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen*. *J Exp Med*, 2010. **207**(10): p. 2097-111.
113. van Rijt, L.S., et al., *Persistent activation of dendritic cells after resolution of allergic airway inflammation breaks tolerance to inhaled allergens in mice*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011. **184**(3): p. 303-11.
114. van Helden, M.J. and B.N. Lambrecht, *Dendritic cells in asthma*. *Curr Opin Immunol*, 2013. **25**(6): p. 745-54.
115. Tang, H., et al., *The T helper type 2 response to cysteine proteases requires dendritic cell-basophil cooperation via ROS-mediated signaling*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(7): p. 608-17.
116. Yoshimoto, T., et al., *Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(7): p. 706-12.
117. Sokol, C.L., et al., *Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(7): p. 713-20.
118. Perrigoue, J.G., et al., *MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(7): p. 697-705.
119. Otsuka, A., et al., *Basophils are required for the induction of Th2 immunity to haptens and peptide antigens*. *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 1739.
120. Gregory, L.G. and C.M. Lloyd, *Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung*. *Trends Immunol*, 2011. **32**(9): p. 402-11.
121. Wills-Karp, M., *Allergen-specific pattern recognition receptor pathways*. *Curr Opin Immunol*, 2010. **22**(6): p. 777-82.
122. Emara, M., et al., *Retagging identifies dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM3)-grabbing non-integrin (DC-SIGN) protein as a novel receptor for a major allergen from house dust mite*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(8): p. 5756-63.
123. Shreffler, W.G., et al., *The major glycoprotein allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, is a ligand of dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin and acts as a Th2 adjuvant in vitro*. *J Immunol*, 2006. **177**(6): p. 3677-85.
124. Trompette, A., et al., *Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein*. *Nature*, 2009. **457**(7229): p. 585-8.
125. Herre, J., et al., *Allergens as immunomodulatory proteins: the cat dander protein Fel d 1 enhances TLR activation by lipid ligands*. *J Immunol*, 2013. **191**(4): p. 1529-35.
126. Nathan, A.T., et al., *Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through beta-glucan-dependent pathways*. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. **123**(3): p. 612-8.
127. Tan, A.M., et al., *TLR4 signaling in stromal cells is critical for the initiation of allergic Th2 responses to inhaled antigen*. *J Immunol*, 2010. **184**(7): p. 3535-44.
128. Eisenbarth, S.C., et al., *Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen*. *J Exp Med*, 2002. **196**(12): p. 1645-51.
129. Daan de Boer, J., et al., *Lipopolysaccharide inhibits Th2 lung inflammation induced by house dust mite allergens in mice*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012. **48**(3): p. 382-9.
130. Ege, M.J., et al., *Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(8): p. 701-9.
131. Conrad, C., et al., *Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells*. *Cancer Res*, 2012. **72**(20): p. 5240-9.
132. von Mutius, E., et al., *Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy*. *Clin Exp Allergy*, 2000. **30**(9): p. 1230-4.

133. Barnig, C., et al., *Indoor dust and air concentrations of endotoxin in urban and rural environments*. Lett Appl Microbiol, 2013. **56**(3): p. 161-7.
134. Ullah, M.A., et al., *Receptor for advanced glycation end products and its ligand high-mobility group box-1 mediate allergic airway sensitization and airway inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **134**(2): p. 440-50.
135. Hosoki, K., et al., *Neutrophil recruitment by allergens contribute to allergic sensitization and allergic inflammation*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2016. **16**(1): p. 45-50.
136. Gilles, S., et al., *The pollen enigma: modulation of the allergic immune response by non-allergenic, pollen-derived compounds*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(16): p. 2314-9.
137. Tighe, H., et al., *Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(1 Pt 1): p. 124-34.
138. Bagarozzi, D.A., Jr., J. Potempa, and J. Travis, *Purification and characterization of an arginine-specific peptidase from ragweed (Ambrosia artemisiifolia) pollen*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **18**(3): p. 363-9.
139. Gunawan, H., et al., *Characterization of Proteases, Proteins, and Eicosanoid-Like Substances in Soluble Extracts from Allergenic Pollen Grains*. Int Arch Allergy Immunol, 2008. **147**(4): p. 276-288.
140. Runswick, S., et al., *Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions*. Respirology, 2007. **12**(6): p. 834-42.
141. Hammad, H., et al., *Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors*. Blood, 2001. **98**(4): p. 1135-41.
142. Kheradmand, F., et al., *A protease-activated pathway underlying Th cell type 2 activation and allergic lung disease*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5904-11.
143. Traidl-Hoffmann, C., et al., *Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization*. J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 627-36.
144. Gutermuth, J., et al., *Immunomodulatory effects of aqueous birch pollen extracts and phytoprostanes on primary immune responses in vivo*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(2): p. 293-9.
145. Mariani, V., et al., *Immunomodulatory mediators from pollen enhance the migratory capacity of dendritic cells and license them for Th2 attraction*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7623-31.
146. Gilles, S., et al., *Pollen metabolome analysis reveals adenosine as a major regulator of dendritic cell-primed T(H) cell responses*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(2): p. 454-461 e1-9.
147. Sathe, P., et al., *Convergent differentiation: myeloid and lymphoid pathways to murine plasmacytoid dendritic cells*. Blood, 2013. **121**(1): p. 11-9.
148. Chen, Y.L., et al., *A type I IFN-Flt3 ligand axis augments plasmacytoid dendritic cell development from common lymphoid progenitors*. J Exp Med, 2013. **210**(12): p. 2515-22.
149. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
150. Szabo, A., et al., *TLR ligands upregulate RIG-I expression in human plasmacytoid dendritic cells in a type I IFN-independent manner*. Immunol Cell Biol, 2014. **92**(8): p. 671-8.
151. Gonzalez-Navajas, J.M., et al., *Immunomodulatory functions of type I interferons*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(2): p. 125-35.
152. Izaguirre, A., et al., *Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(6): p. 1125-38.
153. Kerkmann, M., et al., *Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells*. J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4465-74.

154. Soumelis, V. and Y.J. Liu, *From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation*. Eur J Immunol, 2006. **36**(9): p. 2286-92.
155. Liu, Y.J., *IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 275-306.
156. Wolf, A.I., et al., *Plasmacytoid dendritic cells are dispensable during primary influenza virus infection*. J Immunol, 2009. **182**(2): p. 871-9.
157. Lande, R., et al., *Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis*. J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2815-24.
158. Kim, R., et al., *Potential functional role of plasmacytoid dendritic cells in cancer immunity*. Immunology, 2007. **121**(2): p. 149-57.
159. Yoneyama, H., et al., *Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules*. Int Immunol, 2004. **16**(7): p. 915-28.
160. Shinohara, M.L., et al., *Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 498-506.
161. Gilliet, M., W. Cao, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 594-606.
162. Colonna, M., G. Trinchieri, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells in immunity*. Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1219-26.
163. Kadowaki, N., et al., *Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 219-26.
164. Ito, T., et al., *Two functional subsets of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus and periphery*. Immunity, 2008. **28**(6): p. 870-80.
165. Faget, J., et al., *ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4⁺ T cells*. Cancer Res, 2012. **72**(23): p. 6130-41.
166. Demoulin, S., et al., *Tumor microenvironment converts plasmacytoid dendritic cells into immunosuppressive/tolerogenic cells: insight into the molecular mechanisms*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(3): p. 343-52.
167. Uchida, Y., et al., *Increase of dendritic cells of type 2 (DC2) by altered response to IL-4 in atopic patients*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(6): p. 1005-11.
168. Matsuda, H., et al., *Alteration of balance between myeloid dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells in peripheral blood of patients with asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(8): p. 1050-4.
169. Spears, M., et al., *Peripheral blood dendritic cell subtypes are significantly elevated in subjects with asthma*. Clin Exp Allergy, 2011. **41**(5): p. 665-72.
170. Hagendorens, M.M., et al., *Differences in circulating dendritic cell subtypes in cord blood and peripheral blood of healthy and allergic children*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**(5): p. 633-9.
171. Silver, E., et al., *Lower levels of plasmacytoid dendritic cells in peripheral blood are associated with a diagnosis of asthma 6 yr after severe respiratory syncytial virus bronchiolitis*. Pediatr Allergy Immunol, 2009. **20**(5): p. 471-6.
172. Upham, J.W., et al., *Plasmacytoid dendritic cells during infancy are inversely associated with childhood respiratory tract infections and wheezing*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(4): p. 707-13 e2.
173. Agrawal, D.K., et al., *Flt3 ligand: a novel cytokine prevents allergic asthma in a mouse model*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(12): p. 2081-9.
174. Edwan, J.H., et al., *Flt-3 ligand reverses late allergic response and airway hyper-responsiveness in a mouse model of allergic inflammation*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 5016-23.
175. Edwan, J.H., J.E. Talmadge, and D.K. Agrawal, *Treatment with Flt3 ligand plasmid reverses allergic airway inflammation in ovalbumin-sensitized and -challenged mice*. Int Immunopharmacol, 2005. **5**(2): p. 345-57.

176. Edwan, J.H. and D.K. Agrawal, *Flt3-ligand plasmid prevents the development of pathophysiological features of chronic asthma in a mouse model*. Immunol Res, 2007. **37**(2): p. 147-59.
177. Kool, M., et al., *An anti-inflammatory role for plasmacytoid dendritic cells in allergic airway inflammation*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 1074-82.
178. de Heer, H.J., et al., *Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen*. J Exp Med, 2004. **200**(1): p. 89-98.
179. Oriss, T.B., et al., *Dynamics of dendritic cell phenotype and interactions with CD4+ T cells in airway inflammation and tolerance*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 854-63.
180. Lombardi, V., et al., *CD8alpha(+)beta(-) and CD8alpha(+)beta(+) plasmacytoid dendritic cells induce Foxp3(+) regulatory T cells and prevent the induction of airway hyper-reactivity*. Mucosal Immunol, 2012. **5**(4): p. 432-43.
181. Jahnsen, F.L., et al., *Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123high) dendritic cells in human nasal allergy*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 4062-8.
182. Farkas, L., et al., *Plasmacytoid dendritic cells activate allergen-specific TH2 memory cells: modulation by CpG oligodeoxynucleotides*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(2): p. 436-43.
183. Charbonnier, A.S., et al., *Der p 1-pulsed myeloid and plasmacytoid dendritic cells from house dust mite-sensitized allergic patients dysregulate the T cell response*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(1): p. 91-9.
184. Schroeder, J.T., et al., *TLR9- and FcepsilonRI-mediated responses oppose one another in plasmacytoid dendritic cells by down-regulating receptor expression*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5724-31.
185. Tversky, J.R., et al., *Human blood dendritic cells from allergic subjects have impaired capacity to produce interferon-alpha via Toll-like receptor 9*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(5): p. 781-8.
186. Gill, M.A., et al., *Counterregulation between the FcepsilonRI pathway and antiviral responses in human plasmacytoid dendritic cells*. J Immunol, 2010. **184**(11): p. 5999-6006.
187. Durrani, S.R., et al., *Innate immune responses to rhinovirus are reduced by the high-affinity IgE receptor in allergic asthmatic children*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(2): p. 489-95.
188. Moller-Larsen, S., et al., *Association analysis identifies TLR7 and TLR8 as novel risk genes in asthma and related disorders*. Thorax, 2008. **63**(12): p. 1064-9.
189. Foster, B., D.D. Metcalfe, and C. Prussin, *Human dendritic cell 1 and dendritic cell 2 subsets express FcepsilonRI: correlation with serum IgE and allergic asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(6): p. 1132-8.
190. Cao, W., et al., *Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production*. J Exp Med, 2006. **203**(6): p. 1399-405.
191. Cao, W., et al., *Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction*. J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1603-14.
192. Schroeder, J.T., K.L. Chichester, and A.P. Bieneman, *Toll-like receptor 9 suppression in plasmacytoid dendritic cells after IgE-dependent activation is mediated by autocrine TNF-alpha*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(2): p. 486-91.
193. Tel, J., et al., *IL-4 and IL-13 alter plasmacytoid dendritic cell responsiveness to CpG DNA and herpes simplex virus-1*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(4): p. 900-6.
194. Barr, R., *The possible role of redox-associated protons in growth of plant cells*. J Bioenerg Biomembr, 1991. **23**(3): p. 443-67.
195. Foreman, J., et al., *Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth*. Nature, 2003. **422**(6930): p. 442-6.
196. Van Gestelen, P., H. Asard, and R.J. Caubergs, *Solubilization and Separation of a Plant Plasma Membrane NADPH-O2- Synthase from Other NAD(P)H Oxidoreductases*. Plant Physiol, 1997. **115**(2): p. 543-550.

197. Wang, X.L., et al., *NADPH oxidase activity in allergenic pollen grains of different plant species*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **387**(3): p. 430-4.
198. Bagarozzi, D.A., Jr. and J. Travis, *Ragweed pollen proteolytic enzymes: possible roles in allergies and asthma*. Phytochemistry, 1998. **47**(4): p. 593-8.
199. Stewart, G.A., et al., *Immunobiology of the serine protease allergens from house dust mites*. Am J Ind Med, 1994. **25**(1): p. 105-7.
200. Aoshiba, K., et al., *Serine proteases increase oxidative stress in lung cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **281**(3): p. L556-64.
201. Jung, O., et al., *gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension*. Circulation, 2004. **109**(14): p. 1795-801.
202. Michalec, L., et al., *CCL7 and CXCL10 orchestrate oxidative stress-induced neutrophilic lung inflammation*. J Immunol, 2002. **168**(2): p. 846-52.
203. Garofalo, R., et al., *Transcriptional activation of the interleukin-8 gene by respiratory syncytial virus infection in alveolar epithelial cells: nuclear translocation of the RelA transcription factor as a mechanism producing airway mucosal inflammation*. J Virol, 1996. **70**(12): p. 8773-81.
204. Neuhaus-Steinmetz, U., et al., *Priming of allergic immune responses by repeated ozone exposure in mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(2): p. 228-33.
205. Potocky, M., et al., *Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth*. New Phytol, 2007. **174**(4): p. 742-51.
206. Gomes, A., E. Fernandes, and J.L. Lima, *Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species*. J Biochem Biophys Methods, 2005. **65**(2-3): p. 45-80.
207. Frahry, G. and P. Schopfer, *NADH-stimulated, cyanide-resistant superoxide production in maize coleoptiles analyzed with a tetrazolium-based assay*. Planta, 2001. **212**(2): p. 175-83.
208. Bolwell, G.P., et al., *The origin of the oxidative burst in plants*. Free Radic Res, 1995. **23**(6): p. 517-32.
209. Papadakis, A.K. and K.A. Roubelakis-Angelakis, *The generation of active oxygen species differs in tobacco and grapevine mesophyll protoplasts*. Plant Physiol, 1999. **121**(1): p. 197-206.
210. Messner, K.R. and J.A. Imlay, *In vitro quantitation of biological superoxide and hydrogen peroxide generation*. Methods Enzymol, 2002. **349**: p. 354-61.
211. Wojtaszek, P., *Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection*. Biochem J, 1997. **322** (Pt 3): p. 681-92.
212. Zhou, M., et al., *A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases*. Anal Biochem, 1997. **253**(2): p. 162-8.
213. Magone, M.T., et al., *A novel murine model of allergic conjunctivitis*. Clin Immunol Immunopathol, 1998. **87**(1): p. 75-84.
214. Williams, C.M. and S.J. Galli, *The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(5): p. 847-59.
215. Akagi, M., et al., *Superoxide anion-induced histamine release from rat peritoneal mast cells*. Biol Pharm Bull, 1994. **17**(5): p. 732-4.
216. Peden, D.B., et al., *Hydrogen peroxide effects on rat mast cell function*. Am J Physiol, 1994. **267**(1 Pt 1): p. L85-93.
217. Yoshimaru, T., et al., *Blockade of superoxide generation prevents high-affinity immunoglobulin E receptor-mediated release of allergic mediators by rat mast cell line and human basophils*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(4): p. 612-8.
218. Steiner, D.R., N.C. Gonzalez, and J.G. Wood, *Mast cells mediate the microvascular inflammatory response to systemic hypoxia*. J Appl Physiol (1985), 2003. **94**(1): p. 325-34.

219. Chodaczek, G., et al., *Ragweed pollen-mediated IgE-independent release of biogenic amines from mast cells via induction of mitochondrial dysfunction*. Mol Immunol, 2009. **46**(13): p. 2505-14.
220. Suphioglu, C., et al., *Mechanism of grass-pollen-induced asthma*. Lancet, 1992. **339**(8793): p. 569-72.
221. Barnes, C., et al., *Comparison of outdoor allergenic particles and allergen levels*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000. **84**(1): p. 47-54.
222. Wark, P.A., et al., *Airway inflammation in thunderstorm asthma*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(12): p. 1750-6.
223. Schappi, G.F., et al., *Immunologic significance of respirable atmospheric starch granules containing major birch allergen Bet v 1*. Allergy, 1999. **54**(5): p. 478-83.
224. Grote, M., et al., *Expulsion of allergen-containing materials from hydrated rye grass (*Lolium perenne*) pollen revealed by using immunogold field emission scanning and transmission electron microscopy*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(6 Pt 1): p. 1140-5.
225. Burge, H.A., *An update on pollen and fungal spore aerobiology*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(4): p. 544-52.
226. Taylor, P.E., et al., *Birch pollen rupture and the release of aerosols of respirable allergens*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(10): p. 1591-6.
227. Schappi, G.F., et al., *Concentrations of the major birch tree allergen Bet v 1 in pollen and respirable fine particles in the atmosphere*. J Allergy Clin Immunol, 1997. **100**(5): p. 656-61.
228. Knox, R.B., et al., *Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution*. Clin Exp Allergy, 1997. **27**(3): p. 246-51.
229. Grote, M., R. Valenta, and R. Reichelt, *Abortive pollen germination: a mechanism of allergen release in birch, alder, and hazel revealed by immunogold electron microscopy*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(5): p. 1017-23.
230. Menetrez, M.Y., K.K. Foarde, and D.S. Ensor, *An analytical method for the measurement of nonviable bioaerosols*. J Air Waste Manag Assoc, 2001. **51**(10): p. 1436-42.
231. D'Amato, G., G. Liccardi, and G. Frenguelli, *Thunderstorm-asthma and pollen allergy*. Allergy, 2007. **62**(1): p. 11-6.
232. Visez, N., et al., *Wind-induced mechanical rupture of birch pollen: Potential implications for allergen dispersal*. J Aerosol Sci., 2015. **89**: p. 77-84.
233. Winkler, C., et al., *Surfactant protein D modulates pulmonary clearance of pollen starch granules*. Exp Lung Res, 2010. **36**(9): p. 522-30.
234. Schleh, C., et al., *Surfactant Protein D modulates allergen particle uptake and inflammatory response in a human epithelial airway model*. Respir Res, 2012. **13**: p. 8.
235. Henricks, P.A. and F.P. Nijkamp, *Reactive oxygen species as mediators in asthma*. Pulm Pharmacol Ther, 2001. **14**(6): p. 409-20.
236. Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg, *Reactive oxygen species in cell signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(6): p. L1005-28.
237. Rahman, I., *Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases*. J Biochem Mol Biol, 2003. **36**(1): p. 95-109.
238. Ordonez, C.L., et al., *Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(2): p. 517-23.
239. Nakanishi, A., et al., *Role of gob-5 in mucus overproduction and airway hyperresponsiveness in asthma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5175-80.
240. Dabbagh, K., et al., *IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 6233-7.
241. Grunig, G., et al., *Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma*. Science, 1998. **282**(5397): p. 2261-3.

242. Schneider, T., et al., *Kinetics and quantitation of eosinophil and neutrophil recruitment to allergic lung inflammation in a brown Norway rat model*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **17**(6): p. 702-12.
243. Vural, H. and K. Uzun, *Serum and red blood cell antioxidant status in patients with bronchial asthma*. Can Respir J, 2000. **7**(6): p. 476-80.
244. Misso, N.L., et al., *Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma*. Eur Respir J, 2005. **26**(2): p. 257-64.
245. Moreno-Macias, H. and I. Romieu, *Effects of antioxidant supplements and nutrients on patients with asthma and allergies*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(5): p. 1237-44; quiz 1245.
246. Rahman, I., et al., *Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(4 Pt 1): p. 1055-60.
247. Loschen, G., et al., *Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide*. FEBS Lett, 1974. **42**(1): p. 68-72.
248. Beauchamp, C. and I. Fridovich, *A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase*. J Biol Chem, 1970. **245**(18): p. 4641-6.
249. Nilsson, R., F.M. Pick, and R.C. Bray, *EPR studies on reduction of oxygen to superoxide by some biochemical systems*. Biochim Biophys Acta, 1969. **192**(1): p. 145-8.
250. Floyd, R.A., *Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia*. Faseb J, 1990. **4**(9): p. 2587-97.
251. He, S., et al., *The inhibition of mast cell activation by neutrophil lactoferrin: uptake by mast cells and interaction with tryptase, chymase and cathepsin G*. Biochem Pharmacol, 2003. **65**(6): p. 1007-15.
252. Elrod, K.C., et al., *Lactoferrin, a potent tryptase inhibitor, abolishes late-phase airway responses in allergic sheep*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(2 Pt 1): p. 375-81.
253. Bournazou, I., et al., *Inhibition of eosinophil migration by lactoferrin*. Immunol Cell Biol, 2010. **88**(2): p. 220-3.
254. Choi, G.S., et al., *Serum lactoferrin level as a serologic biomarker for allergic rhinitis*. Clin Exp Allergy, 2010. **40**(3): p. 403-10.
255. Fahn, H.J., et al., *Smoking-associated mitochondrial DNA mutations and lipid peroxidation in human lung tissues*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **19**(6): p. 901-9.
256. Li, N., et al., *Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage*. Environ Health Perspect, 2003. **111**(4): p. 455-60.
257. Servais, S., et al., *Age-related sensitivity to lung oxidative stress during ozone exposure*. Free Radic Res, 2005. **39**(3): p. 305-16.
258. Connell, J.T., *Quantitative intranasal pollen challenges. 3. The priming effect in allergic rhinitis*. J Allergy, 1969. **43**(1): p. 33-44.
259. Xia, T., M. Kovochich, and A.E. Nel, *Impairment of mitochondrial function by particulate matter (PM) and their toxic components: implications for PM-induced cardiovascular and lung disease*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 1238-46.
260. Degli Esposti, M., et al., *Complex I and complex III of mitochondria have common inhibitors acting as ubiquinone antagonists*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **190**(3): p. 1090-6.
261. Bulteau, A.L., L.I. Szveda, and B. Friguet, *Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging*. Exp Gerontol, 2006. **41**(7): p. 653-7.
262. Adam-Vizi, V., *Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(9-10): p. 1140-9.
263. Deng, K., et al., *Reconstitution of mitochondrial processing peptidase from the core proteins (subunits I and II) of bovine heart mitochondrial cytochrome bc(1) complex*. J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6499-505.

264. Choksi, K.B., et al., *Age-related increases in oxidatively damaged proteins of mouse kidney mitochondrial electron transport chain complexes*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(10): p. 1423-38.
265. Choksi, K.B., et al., *Age-related alterations in oxidatively damaged proteins of mouse skeletal muscle mitochondrial electron transport chain complexes*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(6): p. 826-38.
266. Lad, S.P., et al., *Identification of MAVS splicing variants that interfere with RIGI/MAVS pathway signaling*. Mol Immunol, 2008. **45**(8): p. 2277-87.
267. Wen, J.J. and N. Garg, *Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of Trypanosoma cruzi infection*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(12): p. 2072-81.
268. Cocco, T., et al., *Chemical modification of the bovine mitochondrial bc1 complex reveals critical acidic residues involved in the proton pumping activity*. Biochemistry, 1998. **37**(7): p. 2037-43.
269. Molfino, N.A., et al., *Effect of low concentrations of ozone on inhaled allergen responses in asthmatic subjects*. Lancet, 1991. **338**(8761): p. 199-203.
270. Hauser, R., et al., *The upper airway response to pollen is enhanced by exposure to combustion particulates: a pilot human experimental challenge study*. Environ Health Perspect, 2003. **111**(4): p. 472-7.
271. Ciprandi, G., et al., *Allergen-specific nasal challenge: response kinetics of clinical and inflammatory events to rechallenge*. Int Arch Allergy Immunol, 1998. **115**(2): p. 157-61.
272. Olive, P.L., D. Wlodek, and J.P. Banath, *DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis*. Cancer Res, 1991. **51**(17): p. 4671-6.
273. Bacsi, A., et al., *Modulation of DNA-dependent protein kinase activity in chlorambucil-treated cells*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(12): p. 1650-9.
274. Bacsi, A., et al., *Increased ROS generation in subsets of OGG1 knockout fibroblast cells*. Mech Ageing Dev, 2007. **128**(11-12): p. 637-49.
275. Taube, C., et al., *Transient neutrophil infiltration after allergen challenge is dependent on specific antibodies and Fc gamma III receptors*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 4301-9.
276. Knaapen, A.M., et al., *Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review*. Mutagenesis, 2006. **21**(4): p. 225-36.
277. Klungland, A., et al., *Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13300-5.
278. Hazra, T.K., et al., *Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3523-8.
279. Alam, R. and M.M. Gorska, *Mitogen-activated protein kinase signalling and ERK1/2 bistability in asthma*. Clin Exp Allergy, 2011. **41**(2): p. 149-59.
280. Dedon, P.C., et al., *Challenges in developing DNA and RNA biomarkers of inflammation*. Biomark Med, 2007. **1**(2): p. 293-312.
281. Dou, H., S. Mitra, and T.K. Hazra, *Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 49679-84.
282. Mitra, S., et al., *Choreography of oxidative damage repair in mammalian genomes*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(1): p. 15-28.
283. Izumi, T., et al., *Effects of backbone contacts 3' to the abasic site on the cleavage and the product binding by human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1)*. Biochemistry, 2004. **43**(3): p. 684-9.
284. Mitra, S., et al., *Complexities of DNA base excision repair in mammalian cells*. Mol Cells, 1997. **7**(3): p. 305-12.

285. Hegde, M.L., et al., *Oxidative genome damage and its repair in neurodegenerative diseases: function of transition metals as a double-edged sword*. J Alzheimers Dis, 2011. **24 Suppl 2**: p. 183-98.
286. Izumi, T., et al., *Requirement for human AP endonuclease 1 for repair of 3'-blocking damage at DNA single-strand breaks induced by reactive oxygen species*. Carcinogenesis, 2000. **21**(7): p. 1329-34.
287. Hill, J.W., et al., *Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(2): p. 430-8.
288. Sidorenko, V.S., G.A. Nevinsky, and D.O. Zharkov, *Mechanism of interaction between human 8-oxoguanine-DNA glycosylase and AP endonuclease*. DNA Repair (Amst), 2007. **6**(3): p. 317-28.
289. Marichal, T., et al., *DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity*. Nat Med, 2011. **17**(8): p. 996-1002.
290. Fortoul, T.I., et al., *Single-cell gel electrophoresis assay of nasal epithelium and leukocytes from asthmatic and nonasthmatic subjects in Mexico City*. Arch Environ Health, 2003. **58**(6): p. 348-52.
291. Li, G., et al., *8-Oxoguanine-DNA glycosylase 1 deficiency modifies allergic airway inflammation by regulating STAT6 and IL-4 in cells and in mice*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(2): p. 392-401.
292. Thomas, C.E., et al., *Characterization of the radical trapping activity of a novel series of cyclic nitron spin traps*. J Biol Chem, 1996. **271**(6): p. 3097-104.
293. Butterfield, D.A., et al., *Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **854**: p. 448-62.
294. Verhasselt, V., M. Goldman, and F. Willems, *Oxidative stress up-regulates IL-8 and TNF-alpha synthesis by human dendritic cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(11): p. 3886-90.
295. Buttari, B., et al., *Oxidized beta2-glycoprotein I induces human dendritic cell maturation and promotes a T helper type 1 response*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3880-7.
296. Yamada, H., et al., *LPS-induced ROS generation and changes in glutathione level and their relation to the maturation of human monocyte-derived dendritic cells*. Life Sci, 2006. **78**(9): p. 926-33.
297. Thomas, P.G., et al., *Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 5837-41.
298. Tang, S.C., et al., *Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal*. Exp Neurol, 2008. **213**(1): p. 114-21.
299. Imai, Y., et al., *Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury*. Cell, 2008. **133**(2): p. 235-49.
300. McKersie, B.D., F.A. Hoekstra, and L.C. Krieg, *Differences in the susceptibility of plant membrane lipids to peroxidation*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1030**(1): p. 119-26.
301. Mueller, M.J., *Archetype signals in plants: the phytoprostanes*. Curr Opin Plant Biol, 2004. **7**(4): p. 441-8.
302. Li, D.Q., et al., *Short ragweed pollen triggers allergic inflammation through Toll-like receptor 4-dependent thymic stromal lymphopoietin/OX40 ligand/OX40 signaling pathways*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(6): p. 1318-1325 e2.
303. Tan, P.H., et al., *Inhibition of NF-kappa B and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells*. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7633-44.

304. Wilson, I.B., et al., *Core alpha1,3-fucose is a key part of the epitope recognized by antibodies reacting against plant N-linked oligosaccharides and is present in a wide variety of plant extracts*. Glycobiology, 1998. **8**(7): p. 651-61.
305. Xiao, G.G., et al., *Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50781-90.
306. Riedl, M.A. and A.E. Nel, *Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2008. **8**(1): p. 49-56.
307. Kantengwa, S., et al., *Superoxide anions induce the maturation of human dendritic cells*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(3): p. 431-7.
308. Diaz-Sanchez, D., et al., *Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(6): p. 1183-8.
309. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 133-46.
310. Allakhverdi, Z., et al., *Adjuvant activity of pollen grains*. Allergy, 2005. **60**(9): p. 1157-64.
311. Wong, C.K., et al., *Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma*. Clin Exp Immunol, 2001. **125**(2): p. 177-83.
312. Jung, T., et al., *Mechanisms of deficient interferon-gamma production in atopic diseases*. Clin Exp Allergy, 1999. **29**(7): p. 912-9.
313. Hussein, Y.M., et al., *Interferon gamma gene polymorphism as a biochemical marker in Egyptian atopic patients*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2009. **19**(4): p. 292-8.
314. Wang, J., et al., *Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(1): p. 129-38.
315. Akdis, M., et al., *Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells*. J Exp Med, 2004. **199**(11): p. 1567-75.
316. Erpenbeck, V.J., et al., *Surfactant protein D increases phagocytosis and aggregation of pollen-allergen starch granules*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **288**(4): p. L692-8.
317. Baer, H., et al., *The heat stability of short ragweed pollen extract and the importance of individual allergens in skin reactivity*. J Allergy Clin Immunol, 1980. **66**(4): p. 281-5.
318. Wilson, I.B. and F. Altmann, *Structural analysis of N-glycans from allergenic grass, ragweed and tree pollens: core alpha1,3-linked fucose and xylose present in all pollens examined*. Glycoconj J, 1998. **15**(11): p. 1055-70.
319. Hsu, S.C., et al., *Functional interaction of common allergens and a C-type lectin receptor, dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN), on human dendritic cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 7903-10.
320. Okano, M., et al., *Differential role of CD80 and CD86 molecules in the induction and the effector phases of allergic rhinitis in mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(8 Pt 1): p. 1501-7.
321. Kimura, M., et al., *Development of the capacity of peripheral blood mononuclear cells to produce IL-4, IL-5 and IFN-gamma upon stimulation with house dust mite in children with atopic dermatitis*. Int Arch Allergy Immunol, 2002. **127**(3): p. 191-7.
322. Bullens, D.M., et al., *House dust mite-specific T cells in healthy non-atopic children*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(12): p. 1535-41.
323. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
324. Weng, H., et al., *Differential DNA damage induced by H2O2 and bleomycin in subpopulations of human white blood cells*. Mutat Res, 2008. **652**(1): p. 46-53.
325. Rivollier, A., et al., *High expression of antioxidant proteins in dendritic cells: possible implications in atherosclerosis*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(4): p. 726-36.

326. Thoren, F.B., et al., *Cutting edge: Antioxidative properties of myeloid dendritic cells: protection of T cells and NK cells from oxygen radical-induced inactivation and apoptosis*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 21-5.
327. Beutner, K.R., et al., *Therapeutic response of basal cell carcinoma to the immune response modifier imiquimod 5% cream*. J Am Acad Dermatol, 1999. **41**(6): p. 1002-7.
328. Slade, H.B., *Cytokine induction and modifying the immune response to human papilloma virus with imiquimod*. Eur J Dermatol, 1998. **8**(7 Suppl): p. 13-6; discussion 20-2.
329. Rutault, K., et al., *Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells*. Free Radic Biol Med, 1999. **26**(1-2): p. 232-8.
330. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853-66.
331. Malmberg, K.J., et al., *Inhibition of activated/memory (CD45RO(+)) T cells by oxidative stress associated with block of NF-kappaB activation*. J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2595-601.
332. Tailor, P., T. Tamura, and K. Ozato, *IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells*. Cell Res, 2006. **16**(2): p. 134-40.
333. Stout-Delgado, H.W., et al., *Aging impairs IFN regulatory factor 7 up-regulation in plasmacytoid dendritic cells during TLR9 activation*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 6747-56.
334. Ito, T., et al., *Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 105-15.
335. Yu, C.F., et al., *Human plasmacytoid dendritic cells support Th17 cell effector function in response to TLR7 ligation*. J Immunol, 2010. **184**(3): p. 1159-67.
336. Ito, T., et al., *Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4253-9.
337. Dworski, R., et al., *Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(5): p. 1260-6.
338. Bauer, S., et al., *Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9237-42.
339. Lande, R., et al., *Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide*. Nature, 2007. **449**(7162): p. 564-9.
340. Seillet, C., et al., *The TLR-mediated response of plasmacytoid dendritic cells is positively regulated by estradiol in vivo through cell-intrinsic estrogen receptor alpha signaling*. Blood, 2012. **119**(2): p. 454-64.
341. Zhang, Q., K. Itagaki, and C.J. Hauser, *Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase*. Shock, 2010. **34**(1): p. 55-9.
342. Collins, L.V., et al., *Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(6): p. 995-1000.
343. Bode, C., et al., *CpG DNA as a vaccine adjuvant*. Expert Rev Vaccines, 2011. **10**(4): p. 499-511.

10. A DOLGOZATBAN TÁRGYALT CIKKEK MÁSOLATAI