

EGYETEMI DOKTORI (PH.D) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Retinoidok és n-3 többszörösen telítetlen zsírsavak regulációja
atópia esetén

Mihály Johanna



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2011

BEVEZETÉS

Atópia és atópiás dermatitis

Az "atópia" fogalmat Coca és Cooke alkották 1923-ban. Görög eredetű szó, jelentése: szokatlan, különleges. Az atópia allergiás betegségekre való hajlamot fejez ki, mint pl. a bronchiális asztma, allergiás rhinitis és atópiás dermatitis (AD) és az iparilag fejlett országokban akár a népesség 20%-át is érintheti. Az atópia jellemzői: a.) a totál szérum IgE emelkedett szintje (ilyenkor parazita okozta fertőzést vagy más okokat ki kell zárni), b.) allergén specifikus szérum IgE c.) azonnali típusú bőrreakciók. Azonban ezen jelenségek egyike sem kórjelzője az atópiának és nem mindegyiknek kell jelen lennie egyidejűleg.

Az atópiás dermatitis egy rendkívül viszkető, krónikus és relapszáló gyulladásos bőrbetegség, előfordulhat asztmával, élelmiszer-allergiával, allergiás rhinitisszel vagy conjunctivitisszel egyidejűleg. Elsősorban csecsemő- és gyermekkorban fordul elő, de az élet későbbi szakaszában is elkezdődhet és fennmaradhat felnőttkorig, magas családi előfordulással. Az AD prevalenciájában nagy különbségeket lehet megfigyelni, 0,6%-tól 20,5%-ig terjedően. Előfordulási gyakorisága nagyobb a fejlett országokban, bár ennek okai nem ismertek. Két típusú AD-t lehet megkülönböztetni: extrinsic és intrinsic típusokat. Az extrinsic vagy allergiás AD-hez magas totál szérum IgE szint társul, valamint a környezeti és élelmiszer-allergén specifikus IgE jelenléte és előfordulásának gyakorisága a betegek 70-80%-át érinti. Az intrinsic, vagy nem-allergiás AD normál totál IgE értéket mutat, specifikus IgE nem jellemző rá és megközelítőleg a betegek 20% - 30%-át érinti, főleg nők esetében fordul elő.

Az atópiás dermatitis egy örökletes betegség, melyet abnormalitások széles spektruma jellemez, mint a permeabilitás barrier sérülése, gyulladás és rendellenes keratinocita differenciálódás. A bőr fő funkciója, hogy akadályt képez a külső ellenséges környezet és a házigazda belső miliője között; védi a szervezetet a kémiai irritánsok és allergének bőrön keresztüli bejutásától, mechanikai traumától, ultraibolya sugárzástól és a patogén mikroorganizmusoktól. Továbbá megakadályozza a túlzott transz-epidermális vízvesztést, így meggátolva a szervezet kiszáradását.

Az epidermális barrier a stratum corneum mélyebb részén található, amely proteinben gazdag sejtekből (corneocyta) áll, amelyeket módosult dezmoszómák kötnek össze, az úgynevezett corneodezmoszómák. A corneocyták apoláros lipidekben gazdag intercelluláris mátrixba beágyazva és lamelláris lipid rétegbe szerveződve találhatók.

A lamelláris lipid mátrix ceramidokból, koleszterinből, zsírsavakból és koleszterin-észterekből áll. A stratum corneum vastagságának különbözősége miatt az exogén anyagok perkután behatolása a különböző testrészekben változó, a legmagasabb penetráció a stratum corneum legvékonyabb részén fordul elő. Egyének között nagy variabilitás figyelhető meg.

Retinoidok és jelentőségük a bőr élettanában

Az A-vitamin és származékai (retinoidok) fontos szerepet játszanak a bőr élettanában. A retinoidok számos folyamatot szabályoznak, szerepük van a differenciálódásban, proliferációban, apoptózisban, az immunrendszer szabályozásában és az epidermális barrier tulajdonságaiban. Több bőrbetegség, mint az ichtiózis, különböző bőrrákok, akne és egyéb bőrbetegségek összefüggésbe hozhatók a retinoid metabolizmus/jelátvitel változásaival. A retinoidokkal, mint pl. a retinsav vagy szintetikus retinsav analógokkal vagy származékaikkal történő helyi és szisztémás kezeléseket, melyek módosítják a retinoidok metabolizmust, már alkalmazzák bizonyos bőrbetegségek terápiájában.

A táplálékkal bejuttatott retinil-észtereket az enterális hidrolázok retinollá (ROL) hidrolizálják a bélben. A ROL-t és a karotinoidokat bélnyálkahártya sejtek abszorbeálják. A bőrben jelen lévő lecitin:retinol acil-transzferáz (LRAT) retinil-észter szintézist katalizál. A bélből való felszívódást követően a retinoidok két úton állíthatók elő: retinal (RAL) szintetizálható a központi kettős kötés oxidatív hasítása során, ezt a lépést követi a retinollá történő redukció, amely a celluláris retinol kötő fehérjéhez (CRBP1) kötődik. A retinsav (RA) bioszintézise a ROL-ból két lépésben történhet meg. A ROL retinaldehiddé oxidálódik az alkohol-dehidrogenáz (ADH) és a retinol-dehidrogenáz (RDH) enzimek tagjai által katalizált reverzibilis interkonverzió révén, mely tovább oxidálódik retinsavvá retinaldehid-dehidrogenáz enzim (RALDH) segítségével és a citokróm P450 család tagjai

révén. A RA sejten belüli szállítása celluláris retinsav kötő fehérjék (CRABP1, CRABP2) által történik.

Többszörösen telítetlen zsírsavak, étrendi forrásuk, élettani szerepük és anyagcseréjük

Az étkezési zsír egy igen fontos makroelem minden szervezet növekedéséhez és fejlődéséhez. Tápanyag értéke és a membrán lipid összetételre való hatása mellett az étkezési zsírnak nagy hatása van a génexpresszióra is, ami az anyagcsere változásában nyilvánul meg. A többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) immunválaszt is modulálnak, így a különböző gyulladásos megbetegedések esetén jótékony hatásúak.

A C18 szénláncú n-6 és n-3 zsírsavakat több növény szintetizálja, így növényi olajokból, mint például napraforgóolajból vonhatók ki. Azonban a hosszabb láncú zsírsavak vagy közvetlenül állati eredetűek, mint pl. a hal- vagy halolajak, vagy *in vivo* bioszintetizálódnak a rövidebb C18 hosszúságú prekursorok étrendi bevitele révén. A különböző növényi olajok, mint például napraforgó- vagy szójabab olaj és húsipari termékek, főleg n-6 PUFA-kat tartalmaznak, mint a linolsav (LA) (18:2n-6) és az arachidonsav (AA) (18:3 n-6); míg a halolajok túlnyomórészt n-3 zsírsavakat tartalmaznak: eikozapentaénsavat (EPA) (20:5 n-3) és dokozahexaénsavat (DHA) (22:6 n-3).

A PUFA-k több élettani funkciót töltenek be az emlős szervezetben. Mint már korábban említettük, fontos étrendi források, esszenciális makrotápanyagok minden szervezet növekedéséhez és fejlődéséhez. A PUFA-k a sejtek szerkezeti elemei, jelentős hatást gyakorolnak a génexpresszióra, szabályozva a négy transzkripció faktor családot. Továbbá fontos szerepet játszanak a bőrben, hozzájárulva az epidermális barrier fizikai szerkezetének felépítéséhez, hatást gyakorolnak az endogén epidermális foszfolipid zsírsav összetételre, valamint részt vesznek gyulladáscsökkentő és antiproliferatív metabolitok generációjában, így modulálva az immunválaszt.

A PUFA anyagcsere egymást követő $\Delta 6$ -deszaturációs, elongációs és $\Delta 5$ -deszaturációs lépésekből áll. Az LA gamma-linolénsavvá (GLA) deszaturálódik zsírsav-deszaturáz 2 (FADS2) által, tovább elongálódik dihomogamma-linolénsavvá (DHGLA)

ELOVL5 zsírsav-elongáz által, majd arachidonsavvá (AA) metabolizálódik zsírsav-deszaturáz 1 (FADS1) révén. Hasonlóképpen DPA képződik EPA-ból elongáció során és egy intermediér deszaturációs lépés után DHA képződik.

Hormon magreceptorok és retinoidok

A retinsav aktivitását elsősorban retinsav receptorhoz kötve fejt ki, a retinsav receptor (RAR) család és a retinoid X receptor (RXR) család révén. Bebizonyosodott, hogy a retinsav egy RAR-hez kötődve RA válasz elemekhez (RARE) képes kötődni és így modulálni tudja specifikus gének transzkripcióját. Ezek a génexpresszió változások felelősek a retinoidok biológiai és ugyanakkor terápiás hatásaiért.

Három különböző humán RAR-t azonosítottak: RAR α , RAR β és RAR γ . A három RAR gén más-más expressziót mutat különböző sejtekben és a fejlődés különböző szakaszai során. Az RAR α gén transzkriptek a legtöbb embrionális és felnőtt szövetben megtalálhatók és felelősek lehetnek a retinoidok növekedésre és differenciálásra való hatásaiért. Az RAR β csak alacsony szinten expresszálódik a felnőtt humán bőrben, míg a felnőtt bőrben legtöbb RAR receptor az RAR γ .

Az RXR családnak is három receptora van: RXR α , RXR β és RXR γ . Ezek a receptorok mutatnak hasonlóságokat az RAR receptorokkal, de mind szerkezetben, mind ligand specificitásra nézve különböznek az RAR-ektől. Az RXR α receptor a humán epidermiszben mutat legnagyobb expressziót.

Hormon magreceptorok és zsírsavak

Bár leírták, hogy a 9-cisz retinsav az RXR természetes ligandja, a közelmúltban bebizonyították, hogy a receptort aktiválni lehet természetesen előforduló többszörösen telítetlen zsírsavakkal is, mint pl. a dokozaheksaénsav (DHA), arachidonsav vagy fitánsav.

Egyes zsírsavak és oxidációs termékeik képesek peroxiszóma proliferátor aktivált receptorokhoz (PPAR) kötődni és aktiválni azokat. Bebizonyosodott, hogy a linolsav oxidatív metabolizmusa során több olyan bioaktív metabolit keletkezik, amelyek PPAR-okhoz kötődnek. Természetes ligandumként palmitinsavat, olajsavat, linolsavat és

arachidonsavat azonosítottak a humán szérumban, mint a patkány PPAR α endogén aktivátorai. Ellentétben a PPAR α altípussal, a PPAR γ egyértelműen előnyben részesíti a többszörösen telítetlen zsírsavakat. Az esszenciális zsírsavak, mint linolsav, linolénsav, arachidonsav és eikozapentaénsav mikromoláris koncentrációban kötődnek a PPAR γ -hoz. A PPAR β / δ a természetben előforduló többszörösen telítetlen zsírsavak receptora, mint például a dihomogamma-linolénsav, arachidonsav és az EPA.

Célkitűzések

Célkitűzésünk a retinoid metabolizmusban, regulációban és jelátviteli útvonalakban résztvevő gének, retinoid receptorok, valamint retinoid célgének génexpressziós profiljának vizsgálata atópiás dermatitises betegek és egészséges önkéntesek bőrén, továbbá ezen páciensek szérum és bőr retinoid koncentrációjának vizsgálata folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (HPLC-MS-MS) analízissel. További célunk annak megállapítása, hogy az allergiás szenzitizáció, a DHA-dúsított halolajjal történő táplálás valamint az allergiás szenzitizáció a DHA-dúsított halolajjal történő táplálással együtt, hogyan befolyásolja az egér szérumban lévő koleszteril-észterek, triacilglicerolok és foszfolipidészterek százalékos zsírsav eloszlását, valamint az eikozanoid prekursor PUFA-k, mint az EPA, DHA és AA arányát a szérumban.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Bőr biopsziák és a szérum minták

Bőr biopsziás mintákat vettünk 6 atópiás dermatitises betegtől (2 férfi és 4 női beteg; átlagéletkoruk 31 év) az érintett bőr területekről és 6 nem-atópiás, egészséges önkéntestől (2 férfi és 4 női beteg; átlagéletkoruk 30 év) akiknek személyes vagy családi kórtörténetét atópiás betegség nem jellemzi.

Az AD betegek esetében, az egyik biopszia az érintett bőrfelületről, míg a másik biopszia nem érintett bőrfelületről származik. A bőr biopszia kb. 20-30%-a az epidermisz, jelen esetben ezt használtuk a vizsgálatokhoz. A mintákat azonnal lefagyasztottuk száraz jégen és -70 °C-on tároltuk RNS izolálásig vagy HPLC-elemzésig. Ugyanakkor szérum mintákat is nyertünk ki ugyanezeketől a betegektől és -70 °C-on tartottuk elemzésig. A tanulmányt jóváhagyta a helyi etikai bizottság (EA1/168/06) és a betegek beleegyezésüket adták a Helsinki-i nyilatkozat szerint.

mRNS expresszió vizsgálata

A bőrmintákat Tri[®] reagensben homogenizáltuk és totál RNS-t izoláltunk a gyártó útmutatója szerint. Az RNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop spektrofotométerrel (Thermo) mértük, minőségi ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel történt. A real-time kvantitatív PCR (QRT-PCR)-hez, a totál RNS-t cDNS-sé írtuk át Super Script II First Strand Synthesis System (Invitrogen) segítségével. QRT-PCR-t triplikátumban végeztünk ABI Prism 7900-on, előre megtervezett MGB assay-ek segítségével. A relatív mRNS szintek kiszámítása komparatív C_T-vel történt és cyclophilin A mRNS-sel normalizáltunk. Az adatok elemzéséhez Sequence Detector Software-t (2.1 verzió) használtunk.

Folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás analízis

A retinol és a retinsav koncentrációját HPLC-MS-MS módszerrel határoztuk meg humán szérumban és bőr biopsziákban. Összefoglalva, 100 mg bőr biopsziát (ha a minta

100 mg alatt volt, MQ vízzel pótoltuk 100 mg-ig), vagy 100 µl szérumot hígítottunk háromszor annyi izopropanol mennyiséggel, a szövetmintákat ollóval felaprítottuk, 10 másodpercig vortexeltük, ultrahangos fürdőbe helyeztük 5 percig, ráztuk 6 percig, majd 13000 rpm fordulaton centrifugáltuk Heraeus BIOFUGE Fresco centrifuga segítségével +4°C-on. Centrifugálás után a felülúszót Eppendorf koncentrátor 5301-ben (Eppendorf, Németország) szárítottuk 30 ° C-on. A megszáritott extraktumokat újrassuszpendáltuk 60 µl metanolban, vortexeltük, összeráztuk, 40 µl 60 mM-os ammónium-acetát vizes oldatával hígítottuk, automata minta adagolóba helyeztük, majd később elemeztük az adatokat. A HPLC-MS-MS analízist korábban a már leírt módszerrel (Rühl, 2006) Ralph Rühl végezte.

Statisztikai elemzés

Az adatok átlag és szórásként jelenítettük meg. Minden adatpont egy-egy mintacsoportot ír le; minden mintát háromszor mértünk. A statisztikai analízist az SPSS 16.0 program segítségével végeztünk és a 0,05-nél kisebb *p* értéket tekintettük szignifikánsnak.

Állatkísérletek

Az állatkísérletek egy részét a German Institute of Human Nutrition (DIfE) Max Rubner Laboratórium létesítményeiben végezték el Potsdam-Rehbrücke-ben, Németországban. A kísérletet a Land Brandenburg-i etikai hatóságok hagyták jóvá. Egy második kísérletsorozatban az alumínium-hidroxid (Al(OH)₃) hatását vizsgáltuk a lipid-összetételre nézve, erre a Debreceni Egyetemen került sor. A kísérleteket a magyar etikai irányelvek szerint végeztük el.

10-12 hetes C57BL/6 felnőtt nőstény egereket rendeltünk a Charles River-től (Sulzfeld, Németország). Az egereket ellenőrzött körülmények között tartották, szobahőmérsékleten (21 ± 1 °C), állandó relatív páratartalommal (55 ± 5%) és 12 órás sötétség/világosság váltakozása mellett, világosság reggel 6:00 és este 6:00 között volt.

Az egereknek élelemhez és vízhez *ad libitum* hozzáférése volt. Az alapétrend összetétele a következő: 20% kazein, 8% szacharóz, 50% búzakeményítő, 10% napraforgó olaj, 5% cellulóz, 5% ásványi keverék (Mineral-Spurenelemente-Vormischung C1000, Altromin, Lage, Németország) és 2% vitamin keverék (Vitamin-Vormischung C1000 Altromin, Lage, Németország). A DHA-dúsított halolaj tápban a napraforgó olaj 40%-át DHA-gazdag halolajjal (DHA 500TG SR tonhalból, Croda GmbH, Nettetal, Németország) helyettesítettük, amely az állatok tápjában 2% DHA-t és 0,12% EPA-t tett ki.

Az alaptápon élő csoport és a DHA-dúsított halolaj tápon élő csoport, 12-12 egeret tartalmaztak. A második kísérletben, amit az $\text{Al}(\text{OH})_3$ -kezelésre használtunk, mind az alap- és a DHA-dúsított halolaj tápcsoportokban $n = 6$ egér volt.

Az alaptápon és a DHA-dúsított halolaj tápon tartás előtt, az egereket standard egértáppal etették (Sniff, Soest, Németország) és a második kísérletsorozatban, amit az $\text{Al}(\text{OH})_3$ -kezelésre használtunk, az egereket Altromintól származó hagyományos egértáppal ettetük (Lage, Németország). Egy héttel a kísérlet kezdete után 6 egeret ovalbuminnal (OVA), míg 6 egeret foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS) kezeltünk. A második kísérletsorozatban csak az $\text{Al}(\text{OH})_3$ kezelést végeztük hasonló módon. Minden csoportot három intraperitonealis OVA vagy PBS (vagy $\text{Al}(\text{OH})_3$ PBS-ben) injekcióval kezeltünk hetente egyszer a korábban leírt protokoll szerint: 10 μg OVA-t abszorbeáltunk 1,5 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ -hoz, esetenként 100 μl injekciót kapott minden egyes állat. Az egereket négy héttel a táplálás és három héttel az OVA / PBS kezelések után dekapitálással szakrifikáltuk. A vért, kinyerése után 20-30 perccel, 1300g fordulatszámon 3 perccig centrifugáltuk és szérumot nyertünk ki. A szérumot -80°C -on tároltuk elemzésig.

Zsírsvav analízis

A zsírsvav analízist kollaborációs partnereink Prof. Décsi Tamás és Marosvölgyi Tamás végezték el. A plazma zsírsvav profiljának elemzéséhez a fagyasztott plazma mintákat kiolvasztották, majd három belső standardot (dipentadecanoilfoszfadilkolin-, koleszteril-pentadekanoát és- tripentadekanoát) adtak hozzá. A lipid kivonat 3 ml kloroform és 1 ml metanol hozzáadásával történt, a Folch és mtsai által leírt módszer szerint. A keveréket 2000 rpm-en vortexelték 10 perccig, majd az alsó réteget üvegcsékbe

szívták le és párologtatták nitrogén áramlat alatt. A lipid kivonatokat 70 µl kloroformban oldották fel és a lipid osztályok vékonyréteg-kromatográfiával voltak elválasztva. Az oldatok a plazma lipidek vékonyréteg-kromatográfiájához a következők voltak: hexán: dietil-éter: kloroform: ecetsav (21: 6: 3: 1, tf.arány), illetve kloroform: metanol: víz (65: 25: 4, a tf arány). A sávokat diklórfluoreszceinnel festették, kaparással eltávolították és transzészterestették 3 N-os HCl-metanol oldatban 84 °C-on 45 percig.

A zsírsavakat nagyfelbontású kapilláris gázkromatográfia segítségével elemezték Finnigan 9001 gázkromatográfot (Finnigan/Tremetrics Inc., Austin, TX, USA) használva, osztott befecskendezéssel (1:25 arány), automata mintavevő (A200SE, CTC Analitikus, Svájc) és lángionizációs detektorral egy 40 m hosszúságú DB-23 cianopropil oszlopban (J & W Scientific, Folsom, CA, USA).

A hőmérséklet-program a következő volt: az injektor hőmérséklete 80 °C 0,1 percig, a hőmérséklet emelkedik: 180 °C / perc, akár 280 °C-ig, a detektor hőmérséklete 280 °C, az oszlopterület hőmérséklete 60 °C 0,2 perc-ig, a hőmérséklet emelkedik: 40 °C / perc 180 °C-ig, 5 perc izoterm idő, a hőmérséklet növekedése pedig 1,5 °C / perc, egészen 200 °C-ig, 8,5 perc izoterm idő, a hőmérséklet emelkedik: 40 °C / perc 240 °C-ig és 13 perc izoterm időszak. Az állandó lineáris sebesség 0,3 m / sec (100 °C-ra nézve). A csúcsok azonosítása hiteles standardokhoz való hasonlításal történt. A zsírsav eredmények százalékos arányban (tömeg - tömeg) vannak kifejezve, lánchosszúságuk tizenkettő, illetve huszonnégy szénlánc hosszúságú zsírsavak között váltakozik.

Enzimhez kapcsolt ELISA immunoassay

Az ELISA immunoassay-t kollaborációs partnereink Prof. Margitta Worm és Christine Weise (Koch) végezték. A plate-eket 0,1 M bikarbonát pufferrel hígított anti-egér EM95.3 (5 µg/ ml, a monoklonális antitesteket Dr. Lamer biztosította, MPI, Freiburg, Németország) antitesttel inkubálták egy éjszakán át. A 3% tejpor/PBS-sel blokkolt szérumokat (1%-os tejpor / PBS-ben hígított szérum) inkubálták egy éjszakán át és biotin konjugált anti-egér 84 1-C-vel (1 µg / ml) detektálták. A reakciót sztreptavidin

peroxidázzal és tetrametilbenzidinnel (Sigma, Dreieich, Németország) hívták elő és 1 M-os kénsavval állították le. A plate-eket 450/490 nm-en mérték le és a standard görbe alapján számították ki a totál IgE mennyiséget. A totál IgE koncentrációjának meghatározásához standard sort használtak. A standard sorhoz használt minták OVA-specifikus IgE koncentrációját ELISA-val határoztuk meg. Továbbá, minden szérum esetében hígítási sort mértek.

Statisztikai elemzés

A szórásokat SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) szoftver segítségével számítottuk ki, Mann-Whitney teszt segítségével; a $p < 0,05$ érték jelent statisztikailag szignifikáns különbséget.

EREDMÉNYEK

Retinoid jelátviteli útvonalak génexpressziós profilja atópiás dermatitiszes bőr mintákban

Elsőként vizsgáltuk a retinoid anyagcserében, szabályozásban és jelátviteli útvonalakban résztvevő gének, retinoid receptorok, valamint retinoid célgének génexpressziós profilját. Adataink jelentős diszregulációt mutatnak a retinoid homeosztázisban, metabolizmusban és jelátvitelben, mind az érintett, mind a nem érintett AD bőr esetében. Az mRNS expressziós szinteket QRT-PCR segítségével határoztuk meg.

Retinol homeosztázis / retinil-észter szintézis diszregulációja

Az RBP4 retinol kötő fehérje, a retinol transzportjában szerepet játszó szállítófehérje, mRNS expressziója nem szignifikánsan csökkent az érintett és nem érintett atópiás dermatitiszes bőrben az egészséges bőrhöz képest. A diacilglicerol-aciltranszferáz (DGAT) mRNS expressziója kis csökkenést mutatott mind az érintett, mind a nem érintett AD bőrben az egészséges bőrhöz képest, míg a lecitin:retinol aciltranszferázé (LRAT) jelentős fokozódást mutatott a nem érintett bőrben, és nem mutatott változást az érintett atópiás dermatitiszes bőrben.

Retinal szintézis diszregulációja

A béta-karotin monooxygenáz 1 (BCMO1) és 2 (BCMO2) génexpressziós szintje nem mutatott szignifikáns változást az atópiás dermatitiszes bőrben. A retinol dehidrogenázok és alkohol dehidrogenázok a retinol, retinallá való alakításáért felelős enzimek. A retinol dehidrogenáz 2 (RDH2), RDH10 és RDH16 hasonló mRNS expressziós mintázatot mutattak. Az RDH2 szignifikánsan növekedett mind az érintett, mind a nem érintett AD bőrben, az egészséges bőrhöz képest. Az RDH10 és RDH16 mRNS expressziója fokozódást mutatott az érintett AD bőrben, az egészséges bőrhöz képest. Az

alkoholdehidrogenáz (ADH) 1C mRNS expressziója jelentősen csökkent mind az érintett, mint a nem érintett bőrben.

A CRBP1 a retinol intracelluláris szállítója, mRNS expressziója szignifikáns csökkenést mutatott az AD bőrben mind az érintett, mind a nem érintett bőrfelületeken.

Csökkent retinsav szintézis érintett és nem érintett atópiás dermatitises bőrfelületek esetében

A retinal dehidrogenázok (RALDH) vagy acetaldehid dehidrogenázok alakítják át a retinaldehidet retinsavvá. Szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a RALDH1 mRNS expressziós szintjében mind az érintett, mind a nem érintett AD bőrben. A RALDH2 és RALDH3 esetében nem volt megfigyelhető szignifikáns különbség.

A CRABP2 egy intracelluláris retinsav transzporter fehérje, mRNA expressziójában nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget az atópiás dermatitises bőrben. A CRABP1 sem mutatott szignifikáns különbséget a beteg bőrben az egészségeshez képest.

Retinsav degradációs/anyagcsere enzimek csökkent expressziója érintett és nem érintett atópiás dermatitises bőrben

A retinsavat degradáló enzimek expressziós szintje szignifikáns csökkenést mutatott a CYP26A1 és CYP2S1 esetében mind az érintett, mind a nem érintett AD bőrben. A CYP26B1 expressziós szintjét nem tudtuk detektálni kísérletünkben.

Emelkedett RXR α expresszió nem érintett bőrben

Az RAR α mRNS szintek nem mutattak szignifikáns különbséget a beteg bőrben az egészségeshez képest, míg az RAR β expressziója kissé, de nem szignifikánsan fokozódott a nem érintett AD bőrben. Másrészt az RAR γ expresszió nem mutatott változást a beteg bőrben. Az RXR α expresszió szignifikánsan növekedett mind az érintett, mind a nem érintett AD bőrben.

Retinoid célgének expressziója atópiás dermatitisben

A RARRES1 (retinoic acid receptor responder) mRNS expressziója jelentősen csökkent mind az érintett, mind a nem érintett AD bőrben, az egészséges bőrhöz képest. A TGM2 (transzglutamináz) szintje is jelentős csökkenést mutatott mind az érintett, mind a nem érintett AD bőrben. A heparin-kötő epidermális növekedési faktor (HB-EGF) mRNS expressziója hasonló volt mind a beteg, mind az egészséges önkéntesek bőrmintáiban.

Csökkent retinol (ROL) és csupa-transz retinsav (ATRA) koncentráció AD bőrben, de nem AD szérumban

ATRA és ROL koncentrációkat is mértünk az egészséges önkéntesek és betegek bőrbioptíziáiból, valamint szérumaiból.

A bőr ATRA és ROL koncentrációja jelentősen csökkent az érintett (ATRA 0.4 / 0.5 ng/g; ROL 37 / 46 ng/g), és a nem érintett (ATRA 0.3 / 0.6 ng/g; ROL 32 / 54 ng/g) bőrbioptíziákban is, az egészséges bőrbioptíziákhoz (ATRA 0.7 / 1.2 ng/g; ROL 207 / 253 ng/g) képest.

A szérum ATRA és ROL koncentrációja hasonló volt az egészségesekben (ATRA $2,8 \pm 0,8$ ng/ml, ROL 510 ± 217 ng/ml), mint a betegekében (ATRA $2,9 \pm 1,0$ ng/ml, ROL 573 ± 191 ng/ml). Szignifikáns különbségek nem voltak megfigyelhetők az egészségesek és a betegek között.

Szérum lipid osztályok zsírsavösszetétele allergiás szenzitizáció után, DHA-dúsított halolaj tápon vagy anélkül tartott egerekben

Külön tárgyaljuk a különböző tápok és kezelések hatását: a táp hatását [alaptáp (kontroll táp, CTRL) és PBS injekció (CTRL-PBS), illetve DHA-dúsított halolaj táp és PBS injekció (DHA-PBS); alaptáp és OVA injekció (CTRL-OVA), illetve DHA-dúsított

halolaj táp és OVA injekció (DHA-OVA)]; illetve az allergiás szenzitizáció hatását kiegészítő táp nélkül [alaptáp PBS injekcióval (CTRL-PBS), illetve alaptáp OVA injekcióval (CTRL-OVA) és kiegészítő DHA táppal (DHA-dúsított halolaj táp PBS injekcióval (DHA-PBS), illetve DHA-dúsított halolaj táp OVA injekcióval (DHA-OVA)].

Egy második kísérletben, mind az alaptápon tartott, mind a DHA-dúsított halolaj tápon tartott állatokat Al(OH)_3 -dal is kezeltük.

DHA-dúsított halolaj táp hatása allergiás szenzitizáció nélkül (CTRL-PBS és DHA-PBS)

A telített zsírsavak (SFA) és egyszeresen telítetlen zsírsavak (MUFA) összmenyisége hasonló volt a két csoportban, kivéve a magas MUFA értékeket a triacilglicerolok (TAG) esetében. Az n-6 PUFA-k esetében nem kaptunk egyértelmű eredményeket, míg az n-3 PUFA szintek jelentősen megnövekedtek a DHA-dúsított halolaj táp után mindhárom lipid osztályban. A linolsav (LA) szintje szignifikánsan magasabb volt a koleszteril észterekben, míg szignifikánsan alacsonyabb a triacilglicerolokban. Hasonlóan, a gamma linolénsav értékek magasabbak voltak a foszfolipidekben, de jelentősen alacsonyabbak a TAG és koleszteril észterek esetében az n-3 PUFA-val kezelt állatokban, a kontroll csoporthoz képest. A DHGLA értékek mind a koleszteril észterekben, mind a foszfolipidekben jelentősen növekedtek az n-3 PUFA-val kezelt állatokban, a kontroll egerekhez képest. Ezzel ellentétben az AA százalékok szignifikánsan alacsonyabbak voltak mindenhárom szérumban az n-3 PUFA-val táplált állatokban, a kontroll egerekhez képest. Az n-6 PUFA-k szintje mindig alacsonyabb volt az n-3 PUFA-val történő táplálás esetén.

DHA-dúsított halolaj táp hatása allergiás szenzitizációval (CTRL-OVA és DHA-OVA)

Az n-3 PUFA-k értékei szignifikánsan magasabbak voltak a DHA-val és EPA-val táplált állatokban. Az SFA összmenyisége jelentősen emelkedett volt mindegyik szérumban.

lipid osztályban n-3 PUFA kiegészítés után. A MUFA összmenyisége jelentősen emelkedett a foszfolipidekben és koleszteril észterekben, de szignifikánsan csökkent a triacilglicerolokban az n-3 PUFA-val táplált állatok esetében a kontroll állatokhoz képest. Az LA szintek jelentősen magasabbak voltak a koleszteril észterekben, míg jelentősen alacsonyabbak a triacilglicerolokban a DHA és EPA tartalmú tápon tartott állatok esetében. Az AA szintek, valamint az n-6 PUFA-k összmenyisége alacsonyabb volt minden szérumban lipid osztályban az n-3 PUFA-val kezelt állatok esetében. Az n-3 PUFA szintek általában magasabbak voltak DHA kiegészítés után.

Az allergiás szenzitizáció hatása DHA-dúsított táp nélkül (CTRL-PBS és CTRL-OVA)

Az SFA összmenyiség a foszfolipidekben és a triacilglicerolokban hasonló volt mind a szenzitizált, mind a nem szenzitizált állatok esetében, míg a koleszteril észterekben jelentősen csökkent a szenzitizált állatok esetében. A MUFA összmenyiségek hasonlóak voltak a foszfolipidekben, triacilglicerolokban és koleszteril észterekben. Az allergiás szenzitizáció nem okozott jelentős változást az n-6 PUFA értékekben, míg n-3 PUFA értékek főleg a triacilglicerolokban változtak jelentősen: az ALA és DHA jelentősen növekedett, míg az EPA és DPA jelentősen csökkent. Az EPA szint szignifikánsan alacsonyabb volt a triacilglicerolokban és foszfolipidekben, és kissé alacsonyabb a koleszteril észterekben.

Allergiás szenzitizáció hatása DHA-dúsított táppal (DHA-PBS és DHA-OVA)

Az ovalbuminnal történő szenzitizáció DHA-dúsított táp esetén hasonló SFA szinteket mutatott a koleszteril észterekben, de szignifikánsan megnövekedett szintet a triacilglicerolokban és foszfolipidekben. A MUFA összmenyiségek minden lipid osztályban hasonlóak voltak. Az n-6 PUFA értékek hasonlóak voltak a koleszteril észterekben és triacilglicerolokban, míg a foszfolipidekben az n-6 PUFA összmenyiségek jelentősen csökkentek a szenzitizált állatokban.

A lipid osztályok összehasonlítása

A DHA dúsított halolajtápon történő táplálás mindhárom lipid osztály zsírsav összetételét befolyásolta a kontrollhoz képest. Az n-3 PUFA összemennyiség növekedés (DHA-PBS/CTRL-PBS) a triacilglicerolokban (30-szoros) volt a legmagasabb, a foszfolipidek 4-szeres és koleszteril észterek 6-szoros növekedéséhez képest.

EPA/AA, EPA/DHGLA és EPA/DHA arányok

A PBS kezelt egerek zsírsav arányait 100%-ra állítottuk az OVA szenzitizációval való könnyebb összehasonlítás érdekében, alap- és DHA-dúsított halolaj táp történő táplálás után. A triacilglicerolok esetében az EPA/AA arány jelentősen, míg a koleszteril észterekben és foszfolipidekben nem szignifikánsan csökkent az alaptápon tartott egerek esetében $23 \pm 26\%$, $29 \pm 6\%$, $29 \pm 15\%$ allergiás szenzitizáció után, míg DHA-dúsított halolaj táppal történő táplálás után a csökkenés csak $70 \pm 31\%$, $80 \pm 18\%$, $76 \pm 17\%$ volt.

Az EPA/DHGLA arány is csökkent az alaptápon tartott egerek esetében $20 \pm 18\%$ - ra a triacilglicerolokban, $42 \pm 15\%$ - ra a koleszteril észterekben és $36 \pm 22\%$ - ra a foszfolipidekben allergiás szenzitizáció után, jóval kisebb volt a csökkenés a DHA-dúsított halolaj tápon tartott egerek esetében (triacilglicerolok: $92 \pm 51\%$, koleszteril észterek: $66 \pm 26\%$, foszfolipidek: $68 \pm 13\%$)

Az EPA és DHA arány csökkent allergiás szenzitizáció után alaptáp esetében, szignifikánsan a triacilglicerolokban $3 \pm 4\%$ - ra, koleszteril észterekben $26 \pm 6\%$ -ra és foszfolipidekben $19 \pm 9\%$ - ra, az eredeti 100%-hoz képest. DHA-dúsított halolaj táp esetében ez az arány jelentősen magasabb volt a triacilglicerolokban ($119 \pm 11\%$), míg $88 \pm 17\%$ a koleszteril észterekben és $93 \pm 26\%$ a foszfolipidekben.

Az Al(OH)₃-os kezelés hatása a plazma foszfolipidek zsírsav összetételére

Az AA, DHGLA, DHA és EPA szintek nem változtak jelentősen Al(OH)₃ vagy Al(OH)₃-OVA kezelés után sem az alaptápon, sem az n-3 PUFA-n tartott állatok esetében. Az EPA szintek mindig (de nem szignifikánsan) alacsonyabbak voltak az OVA- Al(OH)₃- kezelt egerekben, mint a PBS-kezelt egerekben.

Az EPA/AA, EPA/DHGLA és EPA/DHA arányok hasonló szinten voltak mind az Al(OH)₃-kezelés után, mind a PBS-kezelés után az alaptápon tartott egerek esetében, de nem szignifikánsan alacsonyabbak voltak az OVA-Al(OH)₃-kezelt állatok esetében.

Az EPA/AA, EPA/DHGLA és EPA/DHA arányok csak kissé voltak alacsonyabbak Al(OH)₃-kezelés után, de csak a EPA/DHGLA arány volt szignifikánsan alacsonyabb az n-3 PUFA táppal tartott egerek esetében.

Az n-3 PUFA kiegészítő táp szignifikánsan javította az EPA/AA, EPA/DHGLA és EPA/DHA arányok csökkenését a plazma foszfolipidek esetében OVA-Al(OH)₃-kezelés után, de csak Al(OH)₃-kezelés után nem, az alaptápon tartott állatokhoz képest.

Allergiás szenzitizáció

A szérum IgE szintek jelentősen növekedtek OVA szenzitizáció után a kontroll csoportban $0.4 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ -ről $3.2 \pm 2.0 \mu\text{g/ml}$ -re és a DHA-dúsított táp csoportban $0.7 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ -ről $2.8 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$ -re. A kontroll és a DHA-dúsított tápon tartott csoport IgE szintje között nem voltak szignifikáns eltérések. A szenzitizáció specificitását az OVA-specifikus IgE titerek mérése támasztotta alá a szenzitizált egerekben, míg a nem szenzitizált egerekben OVA-specifikus IgE-t nem detektáltunk.

DISZKUSSZIÓ

A retinoidok számos bőrbetegségben történő eseményt regulálnak, mint epidermális differenciáció, proliferáció, apoptózis, immun válaszok és epidermális barrier homeosztázis. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a retinoidokkal történő táplálás magas IgE szinteket vált ki, valamint megváltoztatja a Th1/Th2 egyensúlyt. Számos, terápiaként használt retinoid (pl retinsav vagy retinsav analógok), hatékony volt bőr- és immunbetegségekben. Az atópiás dermatitis egy krónikus és relapszáló bőrbetegség, károsodott epidermális barrier funkció jellemzi és emelkedett Th2 immunválasz, valamint emelkedett IgE szint. A retinoid metabolizmusban, regulációban és jelátviteli útvonalakban résztvevő gének, retinoid receptorok, valamint retinoid célgének génexpressziós profilját korábban nem vizsgálták atópiás dermatitises betegek bőrén, egészséges önkéntesek bőréhez képest.

Csökkent retinoid koncentráció és retinoid jelátviteli utak humán atópiás dermatitisben

Ebben a tanulmányban kimutattuk, hogy az érintett és nem érintett humán szövet biopsziák retinoid transzportja, szintézise, koncentrációja, jelátvitele és homeosztázisa súlyosan változott az egészséges önkéntesek bőréhez viszonyítva. Meglepő módon még a nem érintett atópiás dermatitises betegektől származó bőrfelületek esetében is megfigyelhető a retinoid jelátvitel diszfunkciója. A legtöbb retinoid válasz célgén mRNS expressziója, mint CRBP1, CYP26A1, CYP2S1, TGM2 és RARRES1 szignifikánsan csökkent expressziót mutat, amely összhangban van az atópiás dermatitises bőrben meghatározott csökkent retinsav szinttel.

Az ATRA a fő RAR ligand és koncentrációja az emlős bőrben, térben és időben szigorúan szabályozott. Kimutatták, hogy különböző sejtípusok a bőrben, különösen a gyulladt bőrben képesek előállítani bioaktív retinsavat. Azt találtuk, hogy retinoid válasz célgének, mint RARRES1, CRBP1, CYP26A1, CYP2S1 és TGM2 jelentősen csökkent expressziót mutattak mind a nem érintett, mind az érintett atópiás betegek bőrén, míg

más retinoid célgénnek kifejeződése, mint RAR β , CRABP2 és HB-EGF nem változott. A HPLC-MS-MS adatok továbbá megerősítették, hogy az ATRA szint sokkal kisebb az érintett és nem érintett AD bőrben az egészséges önkéntesek bőréhez képest; az érintett és nem érintett AD bőr között nem volt különbség. A retinsav prekursor, retinol (ROL), RBP4-en keresztüli csökkent szállítása lehet ennek oka vagy eredménye, ugyanakkor mind a ROL szintje, mind RBP4 kifejeződése csökkent az atópiás dermatitises bőrmintákban az egészséges önkéntesekéhez képest.

A szérum minták vizsgálata hasonló ATRA koncentrációt mutatott a betegeknél és az egészségeseknél. Ezek az adatok szisztémás, nem retinsav alapú, retinoid mediált szignalizáció zavarra utalnak atópiás dermatitisben. Úgy gondoljuk, hogy az ATRA-n kívül (ami a fő jel molekula retinoid génexpresszió esetén), ami sokkal alacsonyabb az atópiás betegek bőrében más, még mindig nem azonosított bioaktív retinoidok és / vagy egyéb retinoid útvonalnak kell léteznie. Az RAR és RXR alternatív aktivátorai felelősek lehetnek a retinoid célgénnek: RAR β , CRABP2 és HB-EGF stabil kifejeződéséért az atópiás bőrben, az ATRA sokkal alacsonyabb koncentrációja esetén is. Az újszerű endogén RAR, valamint RXR ligandok azonosítása már folyamatban van laboratóriumunkban.

A fő retinsav szintetizáló enzim, a RALDH1 kifejeződése jelentősen csökkent az AD bőrben az egészséges bőrhöz képest. Ez a jelentős expresszió csökkenés lehet leginkább felelős az alacsonyabb ATRA koncentrációért az érintett és nem érintett AD bőrben, így a lényegesen alacsonyabb retinoid mediált jelátvitelért is az AD betegek bőrében.

A retinoidok / retinoid jelátviteli útvonalak deficienciáját vagy általában az A-vitamin hiányt különféle atópiás dermatitisben is megjelenő tünettel asszociálták. A Th1/Th2 arány változását, kóros apoptózist, kóros bőr differenciálódást és proliferációt, valamint a fokozott bakteriális kolonizációt a bőrben A-vitamin hiánnyal vagy retinoid receptor mediált szignalizáció károsodásával vagy hiányával hozták összefüggésbe bőr-specifikus transzgénikus egér modellekben. Hogy az alacsonyabb retinoid jelátvitel és az

alacsonyabb retinsav koncentráció az AD bőrben belső rendellenességen alapul-e, még vizsgáljuk laboratóriumunkban különböző *in vivo* tanulmányokban.

Figyelemre méltó a retinoid-célgének CRBP1, CYP26A1, CYP2S1, TGM2, RALDH1, RARRES1 és ADH1C csökkent génexpressziója mind a nem érintett, mind az érintett AD bőrben. Általános és belső abnormalitás lehet felelős ezen regulációs zavarért és egy, talán szisztémás krónikus gyulladás eredménye lehet. Különböző expressziós profil volt megfigyelhető az LRAT és RXR α esetében, amelyek kizárólag a nem érintett AD bőrben fokozódtak, ez ugyancsak az általános intrinszik abnormalitást erősíti meg, ami a retinoid szignalizációért és esetleg más RXR α -heterodimer mediált útvonalakért felelős a nem érintett AD bőrben. Az LRAT és RXR α fokozott expressziója lehet a nem érintett bőrfelület reakciója a krónikus gyulladásra annak érdekében, hogy egyensúlyozza a csökkent retinoid szignalizációt. Ezenkívül az RDH2 és RDH10 fokozott expressziója a bőrben egyensúlyozhatja a csökkent retinoid szignalizációt.

A magas A-vitamin, valamint pro-vitamin A karotinoid fogyasztás jelentősen magasabb szérumban csupa-transz retinsavat eredményez, a zsírok fokozott bevitelével különböző retinoid szignalizációban fontos faktorok/enzimek megnövekedett expressziójához vezet. Mindez hozzájárulhat a retinoid szignalizáció változásához mind az érintett, mind a nem érintett atópiás dermatitises bőrben.

Több, karotinoidokkal és különböző retinoidokkal történő táplakozási kísérlet, valamint a szisztémás gyulladást/allergiás érzékenységet vizsgáló kísérlet van folyamatban, annak kiderítésére, hogy miért csökken a retinoid transzport, szintézis, koncentráció és jelátviteli útvonal, mind az érintett és nem érintett atópiás dermatitises bőrfelületek esetében. E kérdés megválaszolása segíthet megérteni az atópiás dermatitisz patogenezisét és atópia megelőzési stratégiákhoz vezethet. Megfigyeléseink alapján azt mondhatjuk, hogy egyes retinoidok lokális alkalmazása, egyetlen retinoidot vagy szelektív retinoidok kombinációit használva, alkalmas lehet az atópiás dermatitisz kezelésére.

Összegezve, több vizsgálatra van szükség annak érdekében, hogy meghatározzuk, hogyan szabályozott a retinoid transzport, anyagcsere, koncentráció és szignalizáció, valamint a kulcsfontosságú RALDH1 a bőrben, összehasonlítva az AD betegek az egészséges önkéntesek esetét. Arra következtetünk, hogy a retinoid jelátviteli út az AD betegek esetében diszregulálódott a kóros retinoid transzport, szintézis és koncentrációk alapján, amelyek hozzájárulhatnak az AD patogenéziséhez, de ugyanakkor új terápiás megközelítéseket is kínálhatnak.

Tanulmányunkban kimutattuk, hogy a retinoid jelátviteli útvonalak és a retinsav szintje változik atópiás dermatitises betegek bőrében összehasonlítva az egészséges egyének bőrével, továbbá más tanulmányok kimutatták, hogy a zsírsavösszetételben is igen jelentős változások figyelhetők meg az atópiás dermatitises betegek szérumban és bőrben. Másrészt, retinoidokká történő táplálás során magas IgE szinteket és megváltozott Th1/Th2 egyensúlyt észleltek. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy az allergiás szenzitizáció hogyan befolyásolja különböző szérumban lipid osztályok zsírsavösszetételét, illetve az IgE szekréciót egy egér modellben DHA-dúsított halolajjal vagy anélkül történő táplálás során.

Egér szérumban lipid osztályok zsírsav összetétele allergiás szenzitizáció után DHA-dúsított halolajjal vagy anélkül történő táplálás esetén

E tanulmányban bebizonyítottuk, hogy mind a DHA-dúsított halolajjal történő táplálás, mind az allergiás szenzitizáció befolyásolja a különböző lipid osztályok zsírsav összetételét. Három intraperitoneális $\text{Al}(\text{OH})_3$ -OVA injekcióval kiváltott allergiás szenzitizáció emelt IgE szintet váltott ki. Az IgE szintek enyhén voltak alacsonyabbak a DHA-dúsított halolaj tápon tartott egerek esetében a kontroll tápon tartott egerekhez képest. Először írtuk le az irodalomban, hogy az individuális zsírsavak aránya (amelyek pro- és antiinflammatorikus PUFA-metabolitok prekursorai) változik allergiás szenzitizáció után DHA-dúsított halolaj tápon történő táplálással összefüggésben,

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a DHA-val történő táplálás magas DHA és EPA koncentrációhoz vezetett a szérumban lipidekben. Adataink is alátámasztják ezt a tényt

egy olyan egérmódelben, amelyben a zsírsavösszetételt vizsgáltuk triacilglicerol, foszfolipid és koleszteril észterekben. A DHA-dúsított halolajon történő táplálás hatása az EPA szintekre 3 útvonalon keresztül mediálódhat: a) emelkedett EPA koncentráció a DHA-dúsított halolajban, b) a DHA EPA-vá történő retrokonverziója c) csökkent EPA konverzió DHA-vá. Az n-3 hosszú láncú PUFA-k, a DHA és az EPA emelkedett szintje mellett, az n-6 hosszú láncú PUFA-k, mint az AA, szintje jelentősen csökkent. Ez a tény megegyezik korábbi megfigyelésekkel, továbbá tükrözheti a DHA abundanciájának inhibitorikus hatását a delta-6-desaturázra nézve, ami sebesség meghatározó lépés az AA bioszintézisben az alapján, hogy a napraforgó olajban magasabb koncentrációjú AA prekursorok vannak jelen a DHA-dúsított halolajhoz képest.

A zsírsavak kölcsönös hatása a szérumlipidekre még tisztázandó, de mindenesetre a zsírsav összetétel hatása a szérum lipid osztályokra még mindig fontos jelzője a zsír státusznak. Jelen tanulmányban, a táplálkozási beavatkozás mindhárom lipidosztályra hatással volt, míg az allergiás szenzitizáció inkább a szérum triacilglicerolok n-3 hosszú láncú zsírsavaira gyakorolt jelentős hatást.

Tanulmányunk leglényegesebb eredménye az allergiás szenzitizáció hatása a zsírsav összetételre a különböző lipidosztályokban. Tudomásunk szerint korábban nem írták le az allergiás szenzitizáció hatását a szérum zsírsavakra, de sok más tanulmány hasonlította össze a zsírsav státuszt allergiás betegekben és egészségesekben. Lehet, hogy ezek a változások részben a megváltozott lipoprotein eloszlás miatt történnek akut fázis válasz után.

Jelen tanulmányban az allergiás szenzitizáció hatását vizsgáltuk 3 intraperitoneális OVA injekció után felnőtt egerekben, és több szignifikáns változást észleltünk a plazma foszfolipid zsírsav szintekben. Kísérletünk kimutatta, hogy az $\text{Al}(\text{OH})_3$ - nak nincs vagy csak enyhe hatása van a lipid összetételre. A biokémiailag inaktív $\text{Al}(\text{OH})_3$ adjuvánst immunválaszok erősítésére használják. Az $\text{Al}(\text{OH})_3$ intraperitoneálisan adminisztrálva és allergénre abszorbeálva nincs hatással a lipid koncentrációra, míg az aluminium vagy aluminium ionok befolyásolhatják a lipid anyagcserét. Jelentős aluminium vagy

aluminium ion nem jut be a vérkeringésbe, biokémiaiilag stabil $\text{Al}(\text{OH})_3$ fiziológias pH körülmények között történő, intraperitoneális alkalmazása során.

Allergiás szenzitizáció, de nem DHA-dúsított halolajon történő táplálás után, főleg az n-3 PUFA-k, ALA, EPA, DPA és DHA szintje változott jelentősen a triacilglicerolok esetében. Az EPA és a DPA szintje jelentősen csökkent, míg a DHA és ALA szintje jelentősen emelkedett.

Az EPA/AA és EPA/DHGLA arányok szignifikánsan csökkentek allergiás szenzitizáció után, de nem a DHA-dúsított halolajon történő táplálás után. DHA táplálás után, az arányok kevésbé csökkentek. Tehát, az arányok jelentősen alacsonyabbak voltak a nem DHA-dúsított halolajon történő táplálás után, mint a DHA táplálás után.

Kimutatták, hogy a ciklooxygenáz (COX), valamint lipoxigenáz (LOX) útvonalak nagyban függenek a lipid prekursorok hozzáférhetőségétől. Az n-3 PUFA-k jobb lipoxigenázok és gyengébb COX-2 szubsztátok. Továbbá az EPA-tól származó leukotriének kevésbé aktívak, mint az AA-tól származó analógok. Az EPA és más n-3 PUFA gátolhatja is a COX és LOX aktivitást.

Adataink alátámasztják azt a hipotézist miszerint, a DHA-dúsított halolajjal történő táplálás jelentősen megváltoztatja az n-3/n-6 prekursor zsírsavak szintjét és arányát, amelyek proinflammatorikus prosztaglandinokat és leukotriéneket bioaktiválnak. Különböző immunsejtek, mint pl. a limfociták, makrofágok, dendritikus sejtek befolyásolhatják a lipid metabolizmust, különböző enzimek, mint pl. a lipoxigenázok, ciklooxygenázok révén, valamint a táplálkozási zsírok és azok aktív metabolitjai számos immunreakciót befolyásolhatnak. Újabb tanulmányok alátámasztják a tényt, hogy az EPA és DHA, COX és LOX útvonalakon keresztül, antiinflammatorikus prekursorokként szolgálnak olyan bioaktív lipidek esetében, mint a lipoxinok, neuroprotektinek és rezolvinok. A magasabb DHA és EPA szint e származékok emelkedett képződéséhez vezethet az emlős szervezetben a DHA-dúsított halolajjal történő táplálás során és

elképzelhető, hogy csökkentheti az allergiás fenotípus súlyosságát allergiás szenzitizáció esetén.

Összegzésként, adataink azt mutatják, hogy a zsírsav szintek és főleg a zsírsav arányok, amelyek bioaktív lipidek prekursorai allergiás szenzitizáció után jelentősen függenek a DHA-dúsított halolajjal történő táplálástól. A DHA-dúsított halolajjal történő táplálás okozta lipid arány változás, megmagyarázhatja a DHA és / vagy n-3 PUFA-k allergia csökkentő hatását azonban, esetünkben allergia csökkentő hatást nem figyeltünk meg. Csoportunk a továbbiakban a lipid anyagcserére és a DHA lehetséges allergia csökkentő hatására vonatkozó állatkísérleteket és humán táplálkozási tanulmányokat fog végezni.

ÖSSZEFOGLALÁS

A többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) magas koncentrációban vannak jelen az emberi szervezetben és alapvető összetevői a bőr különböző rétegeinek, továbbá számos pro-és anti-inflammatorikus mediátorok prekursorai. Több tanulmány vizsgálta a PUFA összetételt atópiás dermatitiszes betegek és egészséges önkéntesek esetén, és kimutatták, hogy a PUFA mennyisége csökkent az atópiás dermatitiszes bőrben az egészséges bőrhöz képest. A retinoid metabolizmus és jelátvitel változásait több bőrbetegséggel hozták összefüggésbe, beleértve az atópiás dermatitist (AD) is. A retinoid homeosztázisban, szabályozásban és anyagcserében résztvevő gének, a retinoid receptorok és célgének génexpresszióját, valamint a retinoid koncentrációt még nem vizsgálták humán AD bőrben. Egereken végzett korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a retinoidok fokozzák a Th2-mediált válaszokat, illetve IgE-szint emelkedést váltanak ki.

Eredményeink azt mutatják, hogy a retinoid receptor által szabályozott útvonalak célgénjeinek génexpressziója jelentősen csökkent az AD betegekben. A fő retinsav szintetizáló enzim, a retinal-dehidrogenáz 1, szignifikánsan alacsonyabban fejeződött ki AD betegek esetében. A retinoid koncentráció elemzése hasonló csupa-transz retinsav (ATRA) és retinol (ROL) koncentrációt mutatott az AD és egészséges szérumban, de szignifikánsan csökkent az ATRA és ROL koncentrációja az AD bőrben az egészséges bőrhöz képest. Adataink azt mutatják, hogy a retinoid transzport, szintézis, koncentráció, jelátvitel és homeosztázis jelentősen diszregulálódott mind az érintett, mind a nem érintett AD bőrbioptájakban az egészséges önkéntesekéhez képest.

A PUFA esetében a hiányzó pont az volt, hogy meghatározzuk, hogyan változik az n-3 ill. n-6 PUFA százalékos összetétele a nem szenzitizált és szenzitizált DHA-dúsított halolaj tápon élő egerek esetében. A dokozahexaénsav (DHA) és eikozapentaénsav (EPA) szignifikánsan emelkedett százalékos kontribúciója volt megfigyelhető a trigliceridek, koleszteril észterek és foszfolipidek esetén, míg jelentősen alacsonyabb arachidonsav (AA) szintet figyeltünk meg a nem szenzitizált és szenzitizált DHA-dúsított halolaj tápon élő egerek szérumában. Az allergiás szenzitizációt a csökkent EPA/AA arány mutatta minden vizsgált lipid osztályban az alaptápon élő egerek esetében, kisebb mértékben a DHA-dúsított halolaj tápon élő egerek esetében. Allergiás szenzitizáció után a szérum IgE szint jelentősen emelkedett mind az alaptápon, mind a DHA-dúsított halolaj

tápon tartott egerek esetében, de jelentős változás nem volt megfigyelhető a két csoport között.

A PH.D ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /38/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Mihály Johanna

Neptun kód: MYH3NK

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Mihály, J.**, Gamlieli, A., Worm, M., Rühl, R.: Decreased retinoid concentration and retinoid signalling pathways in human atopic dermatitis.
Exp. Dermatol. megjelenés alatt, 5.p., 2011.
IF:3.239 (2009)
2. Rühl, R., Koch, C., Marosvölgyi, T., **Mihály, J.**, Schweigert, F.J., Worm, M., Décsi, T.: Fatty acid composition of serum lipid classes in mice following allergic sensitisation with or without dietary docosahexaenoic acid-enriched fish oil substitution.
Br. J. Nutr. 99 (6), 1239-1246, 2008.
IF:2.764
DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114507862374>

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.03.16



Első szerzős posztetek:

Mihály J., Gamlieli A, Rasche C, Worm M , Rühl R (2010), Dysregulation of retinoid metabolism in human atopic dermatitis, International Symposium “One hundred years of Ivan Djaja’s (Jean Giaja) Belgrade School of Physiology, Belgrade, September 10-14, 2010

Mihály J., Gamlieli A, Rasche C, Worm M , Rühl R (2009), Influence of poly-unsaturated fatty acids and their mono-hydroxylated metabolites on gene expression of nuclear receptor specific target genes, “Mitochondria and reproduction” Workshop, Sofia, Bulgaria, June 1-4, 2010

Mihály J., Gamlieli A, Rasche C, Worm M , Rühl R (2009), Dysregulation of retinoid metabolism in human atopic dermatitis, Journal of Investigative Dermatology 129 (2) 39th ESDR Meeting 2009, Budapest, Hungary, September 9-12, 2009

Mihály J., Gamlieli A, Rasche C, Worm M , Rühl R (2009), Dysregulation of retinoid metabolism in human atopic dermatitis, “Nuclear Receptor Signaling: From Molecular Mechanisms to Integrative Physiology” Summer School, FEBS, Island of Spetses, Greece, August 23 - 28, 2009

Mihály J., Rühl R (2008), „Influence of poly-unsaturated fatty acids, their mono-hydroxylated metabolites and eicosanoids on gene expression of nuclear receptor specific target genes”, Acta Biochimica Polonica, 55 (1), COST Action 926 Conference, Krakow, Poland, 2008

Mihály J., Rühl R (2007), “Influence of poly-unsaturated fatty acids and their mono-hydroxylated metabolites on gene expression of nuclear receptor specific target genes”, Annals Nutr. Metab. 51 (1), 2007, 10th European Nutrition Conference, Paris, France, 2007