

# **Potenciális mitokondriális diszfunkciók a pikkelysömörös tünetmentes bőr keratinocitáiban**

**Matiz Eszter**

Biológia BSc III. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar



SZTE Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar,  
Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika

Témavezető: Dr. Bozó Renáta tudományos munkatárs

Belső konzulens: Dr. Huliák Ildikó, egyetemi adjunktus

SZTE-Természettudományi és Informatikai Kar

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

2022.

## Tartalomjegyzék

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Rövidítések jegyzéke .....                                                           | 4  |
| II. Bevezetés .....                                                                     | 6  |
| 1. A bőr felépítése.....                                                                | 6  |
| 2. Pikkelysömör .....                                                                   | 7  |
| 2.1. Általános jellemzők .....                                                          | 7  |
| 2.1.1. Kialakulását befolyásoló tényezők .....                                          | 7  |
| 2.1.2. Gyulladásos folyamatok és immunérzékenység .....                                 | 8  |
| 2.1.3. A betegség megjelenési formái .....                                              | 8  |
| 2.1.4. A leggyakoribb terápiás lehetőségek .....                                        | 9  |
| 2.2. A pikkelysömörös tünetmentes bőr .....                                             | 9  |
| 3. Mitokondriumok.....                                                                  | 11 |
| 3.1. Mitokondriumok szerkezete.....                                                     | 11 |
| 3.2. Oxidatív foszforiláció .....                                                       | 12 |
| 3.3. Mitokondriális elváltozások bőrbetegségekben.....                                  | 12 |
| 3.4. Mitokondriális elváltozások pikkelysömörben .....                                  | 13 |
| III. Célkitűzések .....                                                                 | 15 |
| IV. Anyagok és módszerek.....                                                           | 16 |
| 1. Bőrminták gyűjtése.....                                                              | 16 |
| 2. Sejtek izolálása és tenyésztése.....                                                 | 16 |
| 3. Mitokondriális funkciók mérése .....                                                 | 17 |
| 3.1. Légzési lánc aktivitásának meghatározása.....                                      | 17 |
| 3.2. Citokróm-c felszabadulás mérés .....                                               | 18 |
| 3.3. Hidrogén-peroxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) termelés mérése .....            | 18 |
| 3.4 Mitokondriális funkciók mérésének értékelése.....                                   | 19 |
| 4. Citospin preparátumok készítése .....                                                | 19 |
| 5. Mitokondriumok fluoreszcens jelölése.....                                            | 19 |
| 5.1. Mitokondriumok direkt immunfluoreszcens jelölése .....                             | 20 |
| 5.2. Mitokondriumok indirekt immunfluoreszcens jelölése .....                           | 20 |
| 5.3. Mitokondriális festések értékelése .....                                           | 20 |
| V. Eredmények és értékelésük .....                                                      | 22 |
| 1. Mitokondriális funkcióbeli eltérések a pikkelysömörös tünetmentes keratinocitákban22 |    |
| 1.1. Légzési lánc eltérései .....                                                       | 23 |
| 1.2. Citokróm-c felszabadulás különbségei .....                                         | 24 |

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.3. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelési különbségek.....                                                   | 25 |
| 2. Immunfluoreszcens mitokondrium jelölések során tapasztalt eltérések.....                                     | 26 |
| 2.1 Festés optimalizálási eredmények.....                                                                       | 26 |
| 2.2 Mitokondrium festődésbeli eltérések az egészséges és a pikkelysömörös tünetmentes keratinociták között..... | 27 |
| VI. Összefoglalás .....                                                                                         | 30 |
| VII. Irodalomjegyzék.....                                                                                       | 32 |
| VIII. Köszönetnyilvánítás.....                                                                                  | 35 |
| IX. Tételes szerzői hozzájárulás .....                                                                          | 36 |

## **I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

AB/AM: antibiotikum/antimikotikum

ADP: adenzin-difoszfát

ATP: adenzin-trifoszfát

CAT: kataláz

CCCP: karbonil-cianid m-klórfenil-hidrazon

COMP: cartilage oligomeric matrix protein

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenolindol

DNS: dezoxi-ribonukleinav

DRP1: dynamin-related protein 1

EDA+ FN: extra A domént hordozó fibronektin splice variáns

FADH<sub>2</sub>: flavin-adenin-dinukleotid

FBS: fetal bovine serum (fötális szarvasmarha szérum)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hidrogén-peroxid

ICAM-1: intracelluláris adhézións molekula 1

IL-1: interleukin-1

IL-18: interleukin-18

IL-8: interleukin-8

MDA: malendialdehid

mitoAB: mitokondrium jelölő antitest

mtDNS: mitokondriális DNS

NADH: nikotinamid-adenin-dinukleotid

NGS: normal goat serum (normál kecske szérum)

NO: nitrogén-monoxid

PBS: phosphate buffered saline (foszfát pufferolt sóoldat)

PBS-EDTA: foszfát pufferolt sóoldat – etilén-diamin-tetraecetsavval

PRINS: Psoriasis Associated Non-Protein Coding RNA Induced By Stress

PSORS: psoriasis susceptible loci

ROS: reaktív oxigéngyök

SNP: single nucleotide polymorphisms

SOD: szuperoxid-dizmutáz

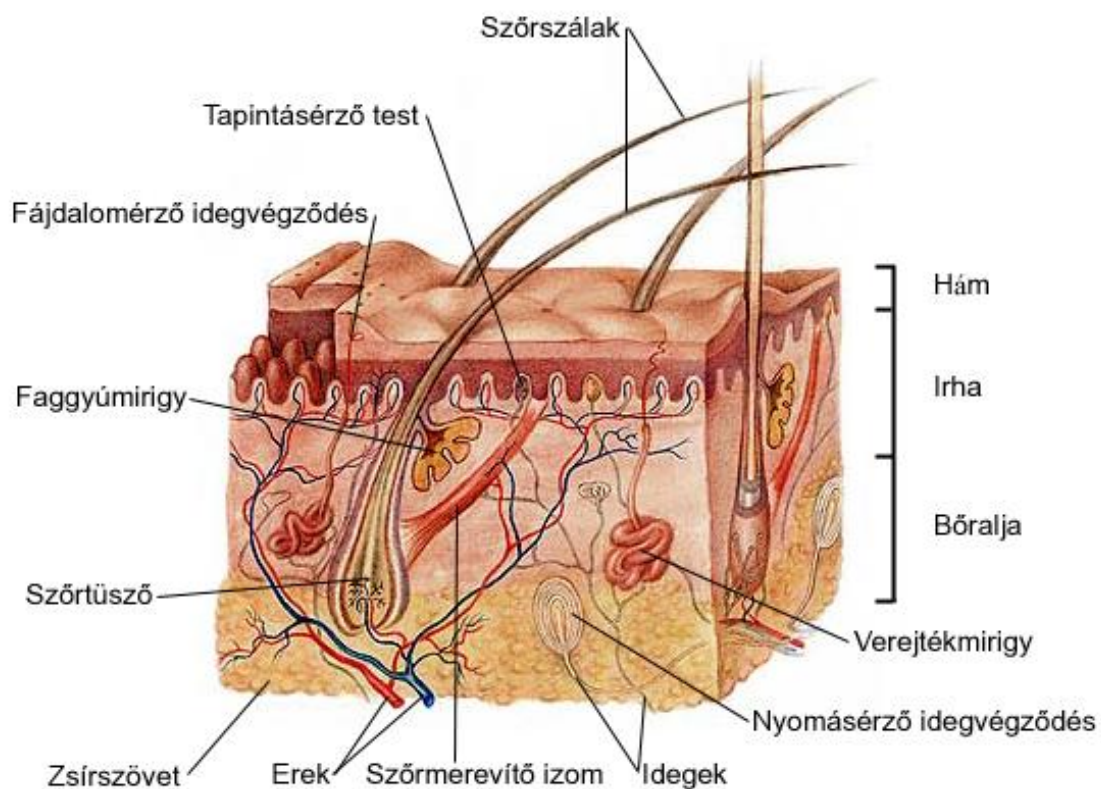
TBS: tris-buffered saline (Tris pufferolt sóoldat)

UCP2: uncoupling protein-2

## II. BEVEZETÉS

### 1. A BŐR FELÉPÍTÉSE ÉS MŰKÖDÉSE

A bőr az emberi szervezet első védelmi vonala, funkciója a szervezet mechanikai, kémiai, fizikai, immunológiai és mikrobiológiai védelme, és a hő- és vízháztartás egyensúlyának biztosítása. A bőrt három fő réteg alkotja. A legfelső réteg a környezettel közvetlen kapcsolatba kerülő, többrétegű elszarusodó laphámból felépülő epidermisz (hám). Az epidermiszt a bazális membrán választja el, a bőr középső rétegétől, amely a dermisz (irha). A bazális membrán szigetelő-, mechanikai- és kommunikatív sejtkapcsoló struktúrákat hordoz. A dermiszt laza rostos kötőszövet alkotja, fontos szerepe van az érzékelésben és a verejtékezés szabályozásában. A hypodermisz (bőralja) a bőr legalsó rétege, gazdagon erezett zsírszövet alkotja, melynek aránya nemenként és testtájanként eltérő. Véd a hidegtől, összeköti a dermiszt a csontokkal, izmokkal, biztosítja a bőr rögzítését, rugalmasságát és mechanikai ellenálló képességét (1. ábra).



1. ábra: A bőr felépítése (Forrás: <https://tudasbazis.sulinet.hu/hu/termeszet tudomanyok/biologia/biologia-8-evfolyam/az-ember-letfenntartó-szervei/a-bor>)

## 2. PIKKELYSÖMÖR

### 2.1. ÁLTALÁNOS JELLEMZŐK



2. ábra: pikkelysömörös bőr (Az SZTE SZAOK Bőrgyógyászai és Allergológiai Klinika archívumából)

A pikkelysömör (psoriasis) a lakosság 1-3%-át érintő, multifaktoriális, immun-mediált bőrgyógyászati kórkép, amely a gyulladásos bőrbetegségek csoportjába tartozik. A betegség patomechanizmusa csak részben ismert, azonban kialakulásában genetikai- és környezeti faktorok egyaránt szerepet játszanak. Krónikus, fellángolásokkal tarkított megbetegedés, vörös, hámló, ezüstös pikkelyekkel borított foltokkal jellemezhető. A plakkok mérete és vastagsága bőrterületenként és egyénenként eltérő lehet, kialakulásukban legnagyobb szerepe a kifejezett granulocitás és a mérsékelt T-sejtes beszűrődés mellett a hámsejtek, azaz a keratinociták fokozott osztódásának van. A betegségnek több megjelenési formája is ismert, a leggyakoribb a plakkos típus (2. ábra). A plakkok leggyakrabban a könyökön, térdén, hajas fejbőrön jelennek meg. A pikkelysömörös bőrben emellett megfigyelhető nagyobb vízvesztés, abnormális pH, károsult hidratációs képesség, megváltozott gén- és fehérje expresszió és sérült enzim-és lipidszintézis (Griffiths és mtsai. 2021; (Kárpáti és Kemény 2013).

#### 2.1.1. KIALAKULÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK

A betegség kialakulása során a környezeti faktorok hatása is ismert, ilyenek a stressz, a fizikai trauma, a dohányzás és az alkoholfogyasztás.

A betegség genetikai szempontból egy bonyolult, poligénes öröklődésű, multifaktoriális betegség és különböző genetikai faktorok fontos szerepet játszanak a kialakulásában. Az emberi genomban ezidáig legalább tizenöt pikkelysömörre hajlamosító lókuszt (psoriasis susceptible loci (PSORS)) azonosítottak (Lowes és mtsai. 2014). A hatodik kromoszómán található a

PSORS1 lókuszt, ami a fő hisztokompatibilitási komplex régiójában helyezkedik el, és ez felelős a genetikai eredet 30-50%-áért (Weller 2008). Ezen a szakaszon helyezkedik el a HLA-Cw6 gén, amely a legfontosabb hajlamosító génszakasz. A teljes genomra kiterjedően asszociációs vizsgálatokat is végeztek, ahol ötven úgynevezett egyedi nukleotid polimorfizmust (single nucleotide polymorphisms (SNP)) azonosítottak, melyek szintén szerepet játszhatnak a pikkelysömör kialakításában.

### **2.1.2. GYULLADÁSOS FOLYAMATOK ÉS IMMUNÉRINTETTSÉG**

A betegség kialakításában fontos szerepet játszanak a szekretált citokinek és kemokinek. A léziók kialakítását feltehetően az indukálja, hogy az immunrendszer fokozottan reagál az említett molekulákra. A betegség kialakulása során számos interleukin, növekedési faktor és adhéziós molekula szintje megváltozik. A keratinociták környezeti stimulusokra adott reakciója eredményeként megemelkedik az interleukin-1 (IL-1), az interleukin-8 (IL-8) és az interleukin-18 (IL-18) mennyisége (Weller 2008). Az IL-1 hatására megemelkedik az intracelluláris adhéziós molekula 1 (ICAM-1) és az E-szelektin szintje. Ezekhez az adhéziós molekulákhoz kapcsolódnak a memória T-sejtek, melyeket az IL-8 és egyéb kemokinek vonzanak az epidermiszbe, hogy ott kapcsolatba lépjenek egymással. Ezek a T-sejtek antigén prezentáló sejteken keresztül (például Langerhans-sejtek) aktiválódnak, majd citokin szekrécióba kezdenek. A keratinociták válasza a felszabaduló citokinekre proliferációt, aktivációt indukál, és elindítja a proinflammatorikus mediátorok (citokinek, kemokinek, antimikrobiális peptidek) szekrécióját, ezzel fokozva a gyulladásos választ (Weller 2008).

### **2.1.3. A BETEGSÉG MEGJELENÉSI FORMÁI**

A *psoriasis vulgaris*, vagy krónikus plakkos típusú pikkelysömör a leggyakoribb megjelenési formája a betegségnek, a betegek 85-90%-át érinti. Általában jól elkülöníthető, hámló, ezüstös színű plakkok jellemzik, melyek leggyakrabban a mechanikai hatásoknak erősen kitett területeken jelentkeznek, például a térdén, könyökön, hajas fejbőrön, de kialakulhat a hajlatokban és a köldök környékén is. A betegség további típusai közé tartozik a *psoriasis guttata*, *erythroderma psoriaticum*, a generalizált *pustulosus psoriasis*, és a lokalizált *pustulosus psoriasis* (Kárpáti és Kemény 2013).

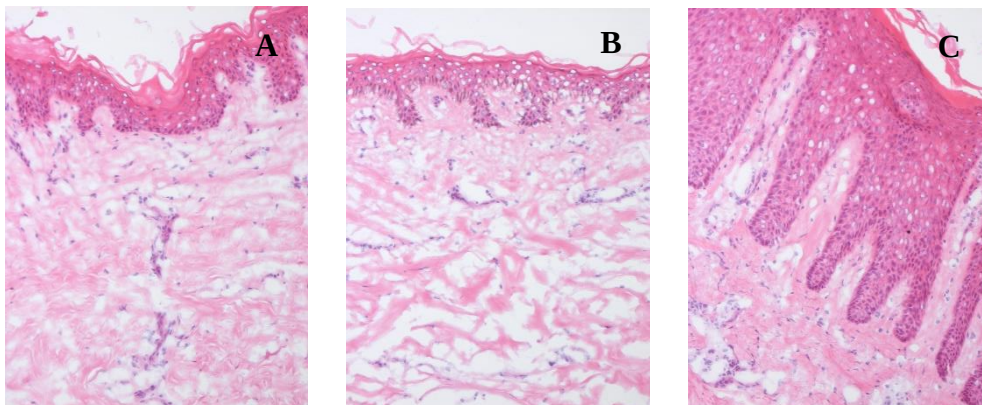
#### 2.1.4. A LEGGYAKORIBB TERÁPIÁS LEHETŐSÉGEK

A betegség kiterjedésétől függően napjainkban már számos lokális vagy szisztémás kezelési lehetőség érhető el, melyek alkalmazásával tartós tünetmentességet lehet elérni, azonban a betegség újbóli kialakulásának megakadályozására jelenleg még nincs megoldás.

A lokális kezelés akkor alkalmazható, ha az érintett terület a teljes testfelület legfeljebb 5%-a. Első lépésként szalicilsav, tejsav vagy karbamid és kén tartalmú kenőccsel kezelik a léziókat, majd az érintett bőrtületen ditranolt, kortikoszteroidokat, retinoidokat, vagy D-vitamin analógokat tartalmazó készítményeket alkalmaznak.

Szisztémás kezelés alkalmazandó, ha a tünetes bőrtület meghaladja a testfelület 20%-át. A szisztémás kezelés történhet UV-val vagy orálisan adható készítményekkel, például retinoidokkal, metotrexáttal, hidroxüreával, ciklosporinnal, mikofenolát-mofetinnel, szulfalazinnal. Emellett napjainkban már számos biológiai terápiás készítmény is rendelkezésre áll, melyek célpontjai főként a betegség patogenezisében szerepet játszó citokinek (pl. Tumor nekrozis faktor-alfa, IL-17, IL-23) (Griffiths és mtsai. 2021; Kárpáti és Kemény 2013).

#### 2.2. A pikkelysömörös tünetmentes bőr



3. ábra: Egészséges (A), pikkelysömörös tünetmentes (B) és pikkelysömörös tünetes (C) bőrből készült metszetek (hematoxin-eozin)

Ugyan a pikkelysömör egy egész testre kiterjedő betegség, azonban megfigyelhetők tünetmentes területek is a betegeken, melyek nem mutatnak makroszkopikusan eltérést. A pikkelysömör egyik érdekessége, hogy a tünetes, azaz léziós bőrtületek jól elkülönülnek a látszólag egészséges megjelenésű tünetmentes területektől. A pikkelysömörös tünetes bőrtületekre jellemző epidermális keratinocita hiperproliferáció és az immunsejtek beszűrődése nem figyelhető meg a tünetmentes területeken (3. ábra). Jellemzi azonban a tünetmentes területeket, hogy sejt- és molekuláris szinten eltérést mutatnak az egészséges és a tünetes bőrhöz képest is, és átmeneti állapotot képvisel az egészséges és a tünetes bőr között (Szél és mtsai. 2019). Korábban úgy gondolták, hogy a tünetmentes bőr elváltozásai a betegség

kialakulására hajlamosító elváltozások lehetnek. Az utóbbi évek eredményei, - melyekhez Kutatócsoportunk korábbi eredményei is hozzájárulnak - rávilágítottak, hogy a hajlamosító tényezők mellett a tünetmentes bőrben olyan folyamatok is jelen vannak, melyek segítik a nem-léziós állapot fenntartását (Kelemen és mtsai. 2021). Megfigyelték, hogy a tünetmentes bőrben a cartilage oligomeric matrix protein (COMP) a bazális membrán folytonosságának megszakadása révén fokozott kölcsönhatást mutat a bazális keratinociták által kifejezett  $\alpha 5 \beta 1$ -integrinnel, melynek eredményeként hozzájárulhat a tünetmentes bazális keratinociták proliferációjának visszaszorításához, ezáltal fenntartva a tünetmentes epidermisz nem léziós, nem hiperproliferatív állapotát. A tünetmentes bőrben nagy mennyiségben találhatóak gyulladásos reakciókat előidéző molekulák, ám ezek nem aktívak. Ezeken a területeken tehát jelen kell lennie gátló faktoroknak, amik fenntartják a nem-léziós állapotot. Ezek az eredmények arra is utalnak, hogy a tünetmentes bőrnek egy úgynevezett „prepszoriaticus” fenotípusa van (Nosbaum és mtsai. 2021).

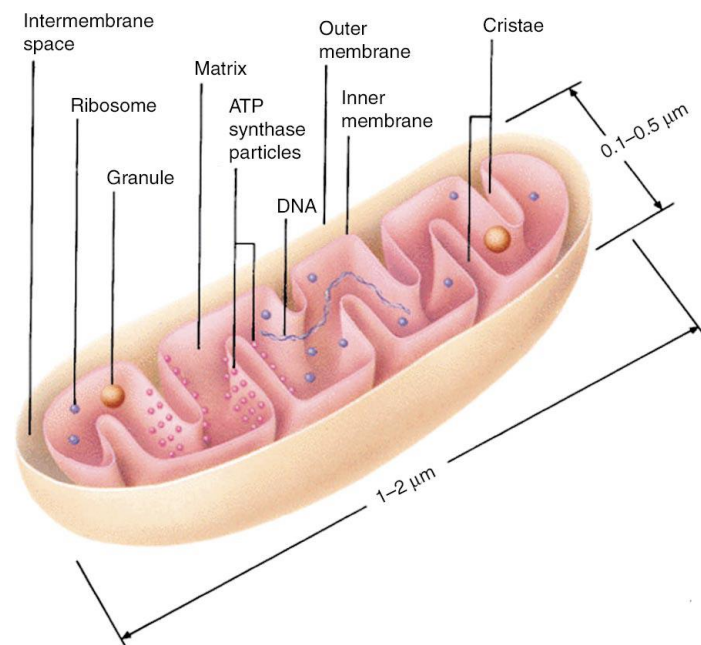
A környezeti faktorokon túl a stressz is bizonyítottan hozzájárul a pikkelysömör kialakításához. Az egyik bizonyíték erre a Köbner jelenség, aminek lényege, hogy addig egészséges bőrön valamilyen trauma hatására léziók jelennek meg (Weiss, Shemer, és Trau 2002). Szintén ismert, hogy a bőrnek azon részei, amik jobban ki vannak téve valamilyen mechanikai stressznek, azok fogékonyabbak a pikkelysömör kialakítására (például könyök, térdek) (Qiao és mtsai. 2019). A mechanikai stressz indukálására gyakran használt módszer a tape-stripping, ami növeli az epidermális proliferációt és a növekedési faktor alfa termelődését a tünetmentes bőrben az egészségeshez képest (Hatta és mtsai. 1997). Mitöbb, a kezelés hatására olyan, a sebgyógyulási folyamatban is szerepet játszó fehérjék szintje is megemelkedik, melyek a pikkelysömörös tünetmentes bőrben fokozott kifejeződést mutatnak, mint az  $\alpha 5$ -integrin, a fibronectin splice variánsa, az EDA+FN, a keratinocita növekedési faktor, és a keratinocita növekedési faktor receptora (Gubán és mtsai. 2016). Egy másik jel a megváltozott stressz-szintre a tünetmentes pikkelysömörös bőrben a megemelkedett kifejeződése a PRINS (Psoriasis Associated Non-Protein Coding RNA Induced By Stress), hosszú, nem kódoló RNS-nek, melynek potenciális szerepe van a keratinociták stresszválaszának regulációjában és a gyulladásos folyamat visszaszorításában (Sonkoly és mtsai. 2005).

Mivel a stressz a környezeti faktorok közül kulcsszerepet játszik a pikkelysömör kialakulásában, és ismert, hogy a tünetmentes bőrben megfigyelhetők a különböző stresszhatások jelei, kutatócsoportunk korábbi munkája során mind az egészséges, mind a

pikkelysömörös tünetmentes bőrben vizsgálta a sejt-stresszhez kapcsolódó fehérjék kifejeződését.

### 3. MITOKONDRIUMOK

#### 3.1. MITOKONDRIUMOK SZERKEZETE

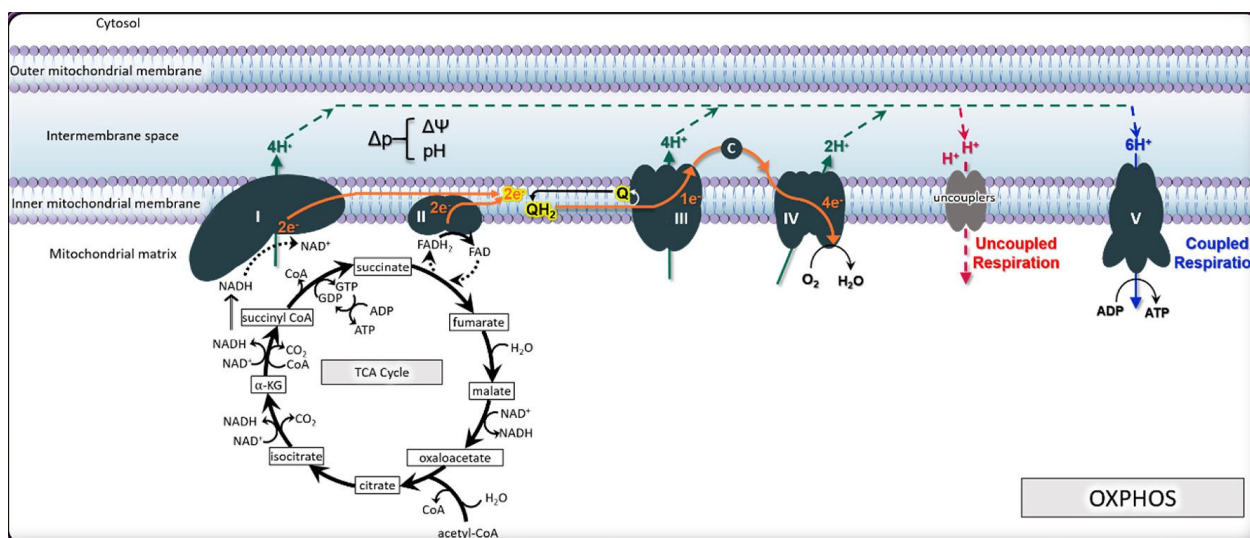


4. ábra: A mitokondrium felépítése (Frey és Manella 2000)

A mitokondriumok az eukarióta sejtek fontos organelumai. A kettős membránnal körbevett sejtalkotó legfontosabb feladata az energiatermelés: az oxidatív foszforiláció során termeli meg a sejtek energiájának 90%-át. Eredete az endoszimbionta elmélettel magyarázható, azaz, hogy egy prokarióta bekebelezett egy másik prokariótát, aminek következtében a mai eukarióta sejtalkotók jellegzetes tulajdonságokkal bírnak. Ilyen a már korábban említett kettős foszfolipid membrán, a saját fehérjeszintetizáló apparátus, és az önálló genom. A külső és a belső membrán közt található az intermembrán tér, ahol enzimek, illetve a transzlációhoz szükséges RNS-ek találhatók (Frey és Mannella 2000). Beljebb haladva a mátrixban a fehérjeszintézis nagyobb részéért felelős riboszómák, granulumok, és a citromsav-ciklus enzimeit lokalizálódnak. A belső membrán felületnövelő képletei a kriszták, melyek felszínén az úgynevezett elemi testek találhatók, melyek tartalmazzák az elektrontranszportlánc enzimeit, illetve adenzin-trifoszfát (ATP)-áz aktivitással rendelkeznek (4. ábra).

### 3.2. OXIDATÍV FOSZFORILÁCIÓ

Az oxidatív foszforiláción keresztül ATP, azaz energia képződik a sejtekben, melyhez a mitokondriális elektrontranszportlánc biztosítja az elektronokat. Az elektrontranszportlánc öt fehérjekomplexet tartalmaz, melyek beágyazódnak a belső membránba. A citromsav-ciklus során termelődő nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) és flavin-adenin-dinukleotid (FADH<sub>2</sub>) az elektrontranszportláncba kapcsolódik be, mindkettő két elektront ad le az I-es és a II-es komplexen keresztül. Az I-es komplex és az ubiquinon közti elektrontranszfer közben négy proton pumpálódik az intermembrán térbe. Az ubiquinon ubiquinollá redukálódik az I-es és II-es komplexről érkező elektronok hatására, majd a III-as komplexnél ismét oxidálódik, miközben egyszerre egy elektron folytatja útját a citokróm-c-n keresztül. Minden citokróm-c-re kerülő elektron után két proton pumpálódik az intermembrán térbe. A citokróm-c az elektronokat a IV-es komplexre szállítja, ahol az elektronakceptor molekuláris oxigén vízzé redukálódik. A membránpotenciál az V-ös komplexben a protonok visszatérésével egyenlítődik ki, ami kapcsolt az adenosin-difoszfát (ADP) ATP-vé alakulásával (5. ábra).



5. ábra: Az oxidatív foszforiláció (Nolfi-Donagan 2020)

### 3.3. MITOKONDRIÁLIS ELVÁLTOZÁSOK BŐRBETEGSÉGEKBE

A mitokondriális elváltozások bármely szervrendszert érinthetik és bármilyen korban manifesztálódhatnak (Nunnari és Suomalainen 2012). Jelenleg ezekre a betegségekre elérhető terápia csupán a tüneteket enyhíti. A mitokondriális elváltozásban szenvedőknek 10%-a mutat valamilyen bőrelváltozást: kiütéseket, pigmentációs zavarokat, szőrzettel kapcsolatos zavarokat és akrocianózist (René G. Feichtinger és mtsai. 2014).

A mitokondriumok szerepet játszanak az oxidatív stresszben, mivel a mitokondriumban lezajló elektrontranszfer egyik komoly következménye a reaktív oxigéngyökök képződése, ami

patológiás elváltozásokat eredményez, hiszen a normál homeosztázis felborul (Nolfi-Donagan, Braganza, és Shiva 2020). A reaktív oxigéngyökök által okozott károk tehát a molekuláris alapjai a különböző patofiziológias állapotoknak, beleértve az öregedést és a tumoros elváltozásokat is.

Az aerob glikolízis több tumort is jelezhet, beleértve a melanomát is. A négyes stádiumú melanoma egyik indikátora a laktát-dehidrogenáz jelenléte. Ugyanakkor korábbi kutatások bizonyítják, hogy a melanoma eltérő patomechanizmussal rendelkezhet, mint a többi tumor, hiszen melanoma esetében az oxidatív foszforiláció sértetlen marad, míg más tumorok esetében csökken a mértéke (Rene' G. Feichtinger és mtsai. 2011). Kimutatták azt is, hogy a BRAF V600E onkogén - ami gyakran jelen van melanoma esetében -, indukálja a glikolízist és a diszfunkciális oxidatív foszforilációt, a mitokondriális légzési lánc kapcsoltságának megszüntetésére irányuló mechanizmusokon keresztül (René G. Feichtinger és mtsai. 2014). A mitokondriális DNS (mtDNS) veleszületett és szomatikus mutációit a legtöbb tumor esetében regisztrálni lehet, a bőrrákok esetében is. Ismert továbbá, hogy a sugárzás és a karcinogének károsítják a mitokondriális DNS-t (Sreedhar, Aguilera-Aguirre, és Singh 2020). Mitokondriális elváltozások vezethetnek egyéb bőrbetegségek kialakulásához, például a pikkelysömörhöz is.

#### **3.4. MITOKONDRIÁLIS ELVÁLTOZÁSOK PIKKELYSÖMÖRBEN**

Korábbi kutatások kimutatták, hogy pikkelysömörös bőrben is ismertek mitokondriális elváltozások (Klug és Schulze 1988). Vizsgálatok kimutatták, hogy pikkelysömörös bőrben a szérum mtDNS szintje magasabb a normál bőrhöz képest. A kutatás során génexpressziós változásokat is vizsgáltak, ahol azt kapták, hogy az uncoupling protein-2 (UCP2), a dynamin-related protein 1 (DRP1) és a calcineurin gének kifejeződése alacsonyabb pikkelysömörös tünetes bőrben az egészséges donorokéhoz képest, ami arra utal, hogy a mtDNS emelkedett szintje a szérumban egy veleszületett patogénként szolgál, ami egy gyulladásos választ indukál, míg az említett gének csökkentett apoptózishoz vezetnek (Therianou és mtsai. 2019). Az extracelluláris mtDNS egyfajta vészjelzőként működik, ami a gyulladást megelőző mediátorok szekréciójához vezet az immunsejtekből akkor is, ha nincs aktív fertőzés. Ismert, hogy a hízósejtek degranulációját mitokondriális osztódás és a mtDNS felszabadulása kíséri sejthalál nélkül (Zhang és mtsai. 2011). Az UCP2 kifejeződésének emelkedése a gyulladáshoz köthető sejtek (hízósejtek, makrofágok stb.) gátlásával jár. A DRP1 a mitokondriumok osztódását szabályozza.

Ismert, hogy a bőr potenciális célpontja az oxidatív stressz hatására keletkező reaktív oxigéngyököknek (ROS), például a nitrogén monoxidnak (NO), a hidrogén-peroxidnak (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) és a malondialdehydnek (MDA), melyek olyan sejtalkotókat támadnak, mint a fehérjék, lipidek

és a DNS. Számos adat utal arra, hogy az oxidatív stressz hatása a pikkelysömör patogenezisére a mitokondriumok oxidatív sérülésén keresztül nyilvánul meg (Chimenti és mtsai. 2018). Pikkelysömörben megfigyelték, hogy a NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és MDA károsítják a sejtalkotókat, és növelik a betegség súlyosságát (Corrocher és mtsai. 1989; Gokhale és mtsai. 2005; Wang 2006). A ROS eltávolításáért különböző humán antioxidáns enzimek által katalizált folyamatok felelősek. Ezek közé az enzimek közé tartoznak a szuperoxid-dizmutázok (SOD), a katalázok és a glutation-peroxidáz (Gabr és Al-Ghadi 2012). Ismert, hogy a pikkelysömörös tünetes epidermiszben az Mn-SOD csökkent kifejeződést mutat (Kobayashi és mtsai. 1991). A citokróm-c mellett, hogy részt vesz a mitokondrium légzési láncának III. és IV. komplexe közötti elektrontranszportban, szerepet játszik az apoptózis regulációjában, antioxidatív enzim funkcióval rendelkezik (Bowman és Bren 2008), ill. a gyulladás aktivációjában is közreműködik (Chimenti és mtsai. 2018). Az oxidatív stressz apoptózist indukáló hatásának közvetítéséhez hozzájárul a citokróm-c emelkedett megjelenése a tünetes bőrben, amellyel szerepet játszik a pikkelysömör patogenezisében (Gabr és Al-Ghadi 2012). Kutatócsoportunk a stresszfehérjék kifejeződésének vizsgálata során azonosította, hogy a citokróm-c nagyobb mennyiségben, a szuperoxid-dizmutáz-2 (Mn-SOD) enzim pedig alacsonyabb szinten van jelen a tünetmentes bőrben az egészségeshez képest. Mindkét molekula mitokondriális funkciókhoz kapcsolható. A vizsgálat elemzése alapján a tünetmentes bőrben az egészségeshez képest legalább kétszeres változást mutató fehérjék megváltozott mitokondriális biogenezisre utalnak a tünetmentes bőrben (Bozó és mtsai. 2021).

### **III. CÉLKITŰZÉSEK**

Hipotézisünk szerint bizonyos mitokondriális elváltozások a pikkelysömörös betegek tünetmentes bőrének epidermiszében is megfigyelhetők. Mivel a tünetmentes bőr keratinocitái stresszhatásokkal szemben fokozott érzékenységet mutatnak és kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai arra utalnak, hogy a tünetmentes bőrben megváltozott kifejeződést mutató sejt-stressz folyamatokhoz köthető fehérjék érinthetik a mitokondriális funkciókat, ezért munkánk során célul tűztük ki a mitokondriális folyamatok összehasonlítását a pikkelysömörös tünetmentes és az egészséges bőr epidermális keratinocitái között.

## **IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **1. BŐRMINTÁK GYŰJTÉSE**

Egészséges donorok (n = 6; 25-60 év) és pikkelysömörben szenvedő betegek (n = 4; 25–60 év) tünetmentes bőrterületeiről punch biopsziákat (d = 6mm) gyűjtöttünk. A betegek nem kaptak lokális terápiát a mintavétel előtti négy hétben, és szisztémás kezelést legalább nyolc hétig. A bőrminták nem voltak kitéve napsugárzásnak. A mintavétel a betegek előzetes tájékoztatása és írásos beleegyezése után történt, megfelelően Klinikánk etikai engedélyének (2799, 3517, PSO-CELL-01, 90/2021, 4969, 2021. április 26., Szeged; PSO-EDAFN-002, 34/2015, 3517, 2015. február 23., Szeged).

### **2. SEJTEK IZOLÁLÁSA ÉS TENYÉSZTÉSE**

HaCaT keratinocita sejtvonalat fagyasztásból vettük fel, majd DMEM tápfolyadékban tenyésztettük 10% főtális szarvasmarha szérummal (fetal bovine serum, (FBS), EuroClone), 1% antibiotikum/antimikotikum (AB/AM, Lonza) oldattal, és 1% L-glutaminnal (Lonza) kiegészítve. A bőrmintákból (egészséges és pikkelysömörös tünetmentes) meghatározott protokoll szerint primer epidermális keratinocita sejteket izoláltunk steril körülmények között. Az izoláláshoz a mintákat 1% AB/AM (Lonza) tartalmú steril fiziológiás sóoldattal (Salsol A, Braun) átmostuk, majd dermisszel lefelé diszpáz (Roche Diagnostics) oldalra fektettük, ezt követően egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. A következő napon a dermiszt elválasztottuk az epidermisztől, majd az epidermiszt 1 ml tripszinbe (Sigma Aldrich) helyeztük és 5 percig inkubáltuk 37 °C-on. Az epidermiszt ezután 8 ml etilén-diamin-tetraecetsavval kiegészített foszfát-pufferolt sóoldatban (Phosphate Buffered Saline (PBS)-EDTA) felszuszpendáltuk, majd átszűrtük az oldatot 100 µm átmérőjű steril szűrőn (Falcon) egy 50 ml-es 1 ml FBS-t tartalmazó centrifugacsőbe. A mintát 10 percen keresztül, 4 °C-on, 1150 rpm-en centrifugáltuk (Heraeus). A felülúszót leöntöttük, szérum mentes keratinocita tenyésztő médiumban neveltük (Gibco Keratinocyte SFM, Life Technologies), melyet 1%-ban AB/AM oldattal (Lonza), 1%-ban L-glutaminnal (Lonza), agyalapi mirigy kivonattal (50 µg/ml, Life Technologies) és epidermális növekedési faktorról (5 ng/ml, Life Technologies) egészítettünk ki. A sejtek optimális növekedésének biztosításához 37 °C-os hőmérsékletet és 5% szén-dioxid koncentrációt alkalmaztunk, a tápfolyadékot 2-4 naponta cseréltük. A sejtek passzálását min. 80%-os konfluenciánál hajtottuk végre, a primer sejtekkel végzett kísérleteket 3. passzázsban végeztük.

### 3. MITOKONDRIÁLIS FUNKCIÓK MÉRÉSE

Az Oroboros O2k (Oroboros Instruments) nagy felbontású respirométer, amely a Clark elektród elvén működik, azaz érzékelni tudja a mérési kamrákban levő oxigénkoncentrációt, ezzel mérve a mitokondrium légzési lánc által elfogyasztott oxigén mennyiségét állandó hőmérsékleten. A különböző légzési lánc szubsztrátok és inhibitorok hozzáadásával mérhetjük az I-es és II-es komplexen keresztül történő légzési aktivitást izoláltan, illetve összesítve is. Mérhetjük továbbá a citokróm-c felszabadulást is, ami a membránkárosodásnak egy potens markere, meghatározhatjuk az oxidatív foszforiláció erősségét, a mitokondriális membrán integritását, illetve a légzési lánc kapcsoltságát, mellyel kapcsolatban az úgynevezett „leak”, azaz szivárgó respirációt is mérni tudjuk.

Mivel korábbi eredményeink a mitokondriális funkciók megváltozására utaltak, ezért Oroboros O2k eszköz használatával a mitokondriális légzési lánc aktivitását, citokróm-c felszabadulást, illetve hidrogén-peroxid termelést mértünk. A mérések során az eszköz kalibrálását MIR05 respirációs pufferrel (Sigma Aldrich) végeztük, amely az állandó közeget biztosította a sejteknek a mérések során, majd folyamatosan monitoroztuk a közeg oxigén koncentrációját, ill. az oxigén áramlását, azaz az oxigénszint változásának sebességét az adott térfogathoz viszonyítva. Minden mérési típushoz előkísérleteket végeztünk HaCaT keratinocita sejtvonal felhasználásával. Ezt követően a beállított protokollokat teszteltük primer egészséges keratinocita sejteken, majd egészséges és pikkelysömörös tünetmentes donorok epidermális keratinocitáinak felhasználásával összehasonlító méréseket végeztünk. A mérésekhez átlagosan egymillió sejtet használtunk csoportonként. A további leírásokban az optimalizált protokoll található.

#### 3.1. LÉGZÉSI LÁNC AKTIVITÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSA

Az oxidatív-foszforiláció mérésének meghatározásához a sejtek bemérését követően rögzítettük a sejtek alap légzési aktivitását, majd a légzési lánc II. komplexének szubsztrátját, a szukcinátot (10 mM végkoncentráció, Sigma Aldrich) és az ATP szintézishez szükséges ADP-t (1,25 mM végkoncentráció, Sigma Andrich) adtunk a rendszerhez. A membrán átjárhatóságát digitonin (4,05  $\mu$ M végkoncentráció, Sigma Aldrich) hozzáadásával biztosítottuk. Így határoztuk meg az oxidatív foszforiláció mértékét. Ezt követően oligomycin (5 nM, végkoncentráció, Sigma Aldrich) hozzáadásával gátoltuk az ATP-szintáz blokkolva annak proton csatornáját, amely az ADP ATP-vé történő oxidatív foszforilációjához szükséges. Így nemcsak az ATP szintézis, hanem a légzés is blokkolódik, és indukálódik a „leak”, azaz szivárgó respiráció. A protonofór/ $H^+$ -ionofór karbonil-cianid m-klórfenil-hidrazon (CCCP, 2,5

$\mu\text{M}$  végkoncentráció, Sigma Aldrich) kémiai szétkapcsoló anyag hozzáadásával meghatároztuk a maximális mitokondriális légzési kapacitást. Ezt követően rotenon ( $5 \mu\text{M}$  végkoncentráció, Sigma Aldrich) hozzáadásával blokkoltuk a légzési lánc I-es-, antimycin A ( $2,5 \mu\text{M}$  végkoncentráció, Sigma Aldrich) hozzáadásával pedig a III-as komplexének aktivitását két lépésben blokkolva a reziduális oxigén áramlást. A mérések végéig folyamatosan nőtt a sejtek oxigénfogyasztása, ezáltal csökkent a közeg oxigén koncentrációja, az antimycin A hozzáadását követően a sejtek elpusztultak.

### **3.2. CITOKRÓM-C FELSZABADULÁS MÉRÉS**

A citokróm-c felszabadulás mérés során az előző, 3.1 pontban leírtak alapján először szukcinátot, ADP-t és digitonint adtunk a rendszerhez, hogy biztosítsuk az oxidatív foszforiláció mérését. Ezt követően citokróm-c-t ( $10 \mu\text{M}$  végkoncentráció, Sigma Aldrich) adtunk a rendszerhez. Abban az esetben tapasztalunk citokróm-c hozzáadását követően növekedést az oxigén áramlásában, ha a mitokondrium belső membránjában sérülés található, aminek eredményeként a hozzáadott citokróm-c be tud kapcsolódni a légzési láncba, és szállítja az elektronokat a légzési lánc III-as és VI-es komplexe között, közvetett módon következtethetünk a hiányzó/korábban felszabadult citokróm-c mennyiségére. Ha nincs membránsérülés, az oxigénáramlás változatlan marad. A mérést az előző 3.1 pontban leírtak szerint rotenon és antimycin A hozzáadásával zártuk.

### **3.3. HIDROGÉN-PEROXID ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) TERMELÉS MÉRÉSE**

A sejtek  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelésének meghatározásához fluoreszcencián alapuló módszert alkalmaztunk az Oroboros O2k rendszerben. A méréshez torna-peroxidázt (HRP), és Amplex Red-et (Thermo Fischer Scientific), a peroxidáz fluorogén szubsztátját juttattuk a rendszerbe. Az Amplex Red  $\text{H}_2\text{O}_2$  jelenlétében az erősen fluoreszkáló resorufinná alakul, amely a készülék zöld fluoreszcens szenzorával érzékelhető (excitáció:  $525 \text{ nm}$ ). Ehhez először Amplex Red, HRP és a  $\text{H}_2\text{O}_2$  ismert koncentrációban történő hozzáadásával kalibrációt készítettünk. Ezt követően végeztük a sejtekkel a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelés mérését, melynek mértékének meghatározásához először az Amplex Red-et és a HRP-t mértük a sejtekhez, majd a membrán permeabilitását biztosító digitonint. Ezután rotenon hozzáadásával biztosítottuk, hogy az I-es komplex aktivitása ne zavarja a mérést. Így rögzítettük a sejtek normál  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelését. A szukcinát és ADP hozzáadásával az oxidatív foszforiláció során termelődő  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelés mértékét tudtuk meghatározni. Majd oligomycin hozzáadásával indukáltuk a szivárgó respirációt, és meghatároztuk a szivárgó respiráció során termelődő  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelését. Az

anyagokat a 3.1 pontban részletezett mennyiségek szerint alkalmaztuk. A  $\text{H}_2\text{O}_2$  mennyiségét az előzetes kalibráció alapján számoltuk ki.

### **3.4. MITOKONDRIÁLIS FUNKCIÓK MÉRÉSÉNEK ÉRTÉKELÉSE**

Az Oroboros O2k rendszerben végzett méréseink kiértékelése a DatLab (Oroboros Instruments) program segítségével az SZTE SZAOK Sebészeti és Műtéttani Intézet és Traumatológiai Klinika munkatársainak közreműködésével. Az egészséges és pikkelysömörös tünetmentes epidermális keratinocita sejtek mérései közötti különbségek meghatározásához kétmintás T-próbát (Microsoft Excel) és egyszempontos ANOVA-t (Sigma Plot) használtunk. Az eredményt szignifikánsnak tekintettük  $p \leq 0,05$  esetén.

### **4. CITOSPIN PREPARÁTUMOK KÉSZÍTÉSE**

HaCaT-, primer egészséges- ( $n=6$ ), és pikkelysömörös tünetmentes ( $n=4$ ) keratinocita sejtenyészetekből citospin preparátumokat készítettünk. A módszer lényege, hogy segítségével szuszpenzióban lévő sejtek tárgylemezre transzferálhatók, és ezt követően mikroszkópos elemzésre használhatók. Ehhez tárgylemezenként min. 20000 sejtet 600 rpm-en 6 percig centrifugáltuk citocentrifuga segítségével. Ezt követően a mintákat szobahőmérsékleten megszárítottuk és  $4^\circ\text{C}$ -on tároltuk a későbbi felhasználásig.

### **5. MITOKONDRIUMOK FLUORESzcENS JELÖLÉSE**

A citospin preparátumokon immunfluoreszcens festéseket végeztünk a mitokondriumok jelöléséhez. Kétféle festést állítottunk be, egy direkt és egy indirekt festési protokollt. A festéseket először HaCaT citospin mintákon állítottuk be, majd normál egészséges keratinocita sejteken is teszteltük, hogy hasonlóan működnek-e a protokollok. Ezt követően végeztük el a festéseket a mérésekhez is használt egészséges és pikkelysömörös tünetmentes keratinocita sejteken. A direkt immunfluoreszcens protokollnál specifikus, sejtpermeabilis, fluoreszcensen jelölt mitokondrium jelölő festéket használtunk (MitoSpy Orange CMTMRos, BioLegend). Az indirekt immunfluoreszcens mitokondrium festésnél specifikus mitokondrium jelölő elsődleges antitestet (MitoAB, BioTechne) és Alexa Fluor 647 fluorofórral konjugált másodlagos antitestet (Life Technologies) alkalmaztunk. A sejtmagok jelölésére 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI, Sigma Aldrich) festéket használtunk. A mintákat immunfluoreszcens mounting médiummal (Dako) fedtük le, minimum 30 percig szárítottuk őket szobahőmérsékleten, majd a mikroszkópos vizsgálatig  $4^\circ\text{C}$ -on tároltuk őket.

## **6. MITOKONDRIUMOK DIREKT IMMUNFLUORESZCENS JELÖLÉSE**

A festési protokoll első lépéseként a mintákat 4 % - os paraformaldehid oldattal fixáltuk 10 percig. Ezt 3 x 5 perc PBS-es mosás követte, majd a sejtmembránt permeabilizáltuk 0,25% TritonX-100/PBS-sel 5 percig. Újabb mosási ciklus után 1% szarvasmarha szérum albumin (BSA, Sigma Aldrich)/PBS-el blokkoltuk a mintáinkat 30 percig. Ezt követően felvittük a PBS-ben kihígított MitoSpy (BioLegend) festéket a mintákra 250 mM végkoncentrációban majd újabb 30 percig inkubáltuk. Negatív kontrollként festéket nem tartalmazó mintát is készítettünk. Ezután ismét 3 x 5 perces PBS-es mosás következett, majd DAPI (1 µg/ml végkoncentráció, Sigma Aldrich) festékkel jelöltük a sejtmagokat, amivel további 5 percig inkubáltuk. Az utolsó mosás 3 x 2 perc volt, PBS-sel.

## **7. MITOKONDRIUMOK INDIREKT IMMUNFLUORESZCENS JELÖLÉSE**

A festési protokoll első lépéseként a mintákat 4 % - os paraformaldehid oldattal fixáltuk 10 percig. Ezt 3 x 5 perc PBS-es mosás követte, majd a sejtmembránt permeabilizáltuk 0,25% TritonX-100 (Thermo Fischer Scientific)/PBS-sel 5 percig. Újabb mosási ciklus után 1 % BSA (Sigma Aldrich)/PBS-el blokkoltuk a mintáinkat 30 percig. Ezt követően 4 °C-on egy éjszakán át alkalmaztuk a mitokondrium jelölő elsődleges antitestet a mintákon (MitoAB, egérben termeltetett anti-humán monoklonális antitest 1:200 hígításban 1 % normál kecske szérumot (NGS) tartalmazó Tris pufferolt sóoldatban (TBS)). Az izotípus kontroll mintához egér IgG1κ (BioLegend) antitestet használtuk az elsődleges antitesttel egyidejűleg. Másnap ismét 3 x 5 perces PBS-es mosás következett, majd kecskében termeltetett anti-egér Alexa Fluor 647 konjugált másodlagos antitestet (1:500 hígításban 1% NGS/TBS-ben) alkalmaztuk a mintákon egy órás inkubációval. Majd a 3 x 5 perces mosási ciklus után DAPI (1 µg/ml végkoncentráció, Sigma Aldrich) festékkel jelöltük a sejtmagokat, amit 5 percig hagytunk rajta. Az utolsó mosás 3 x 2 perc volt, PBS-sel.

## **8. MITOKONDRIÁLIS FESTÉSEK ÉRTÉKELÉSE**

A fluoreszcens festésekről 20x és 40x (immerziós olajjal kiegészítve) nagyításban képeket készítettünk Zeiss AxioImagerZ1 (Zeiss) mikroszkóppal. A felvételek készítéséhez a Zen2012 Blue Edition (Zeiss) programot használtuk. A mitokondriumok mennyiségének szemikvantitatív meghatározásához a fluoreszcensen jelölt egészséges és a pikkelysömörös tünetmentes keratinocitákról minimum 3-3 20x nagyítású felvételt készítettünk. A fluoreszcens festések kiértékelése ImageJ (BD Biosciences) programban történt. Ehhez a mikroszkópos képeken szétválasztottuk a DAPI, illetve a mitokondrium jelölő antitest csatornáját. A mitokondriumok fluoreszcencia intenzitását a program beépített funkciójával mértük le, a

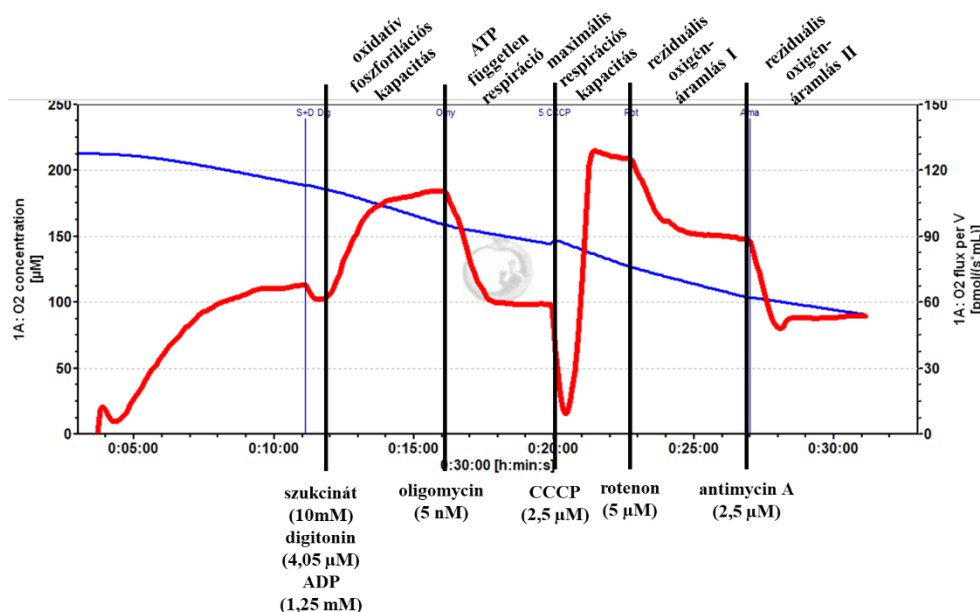
mitokondrium jelölő antitest jele alapján. Az összsejtszámot egy-egy képen az ImageJ program Cell Counter pluginjének segítségével határoztuk meg a DAPI jel alapján. Csak azokat a sejteket számoltuk bele az összsejtszámba, amelyeknek a sejtmagja teljesen rajta volt a képen. Az erősebben festődő sejtek számát is hasonlóképpen határoztuk meg, majd kiszámoltuk az intenzívebben festődő sejtek százalékos arányát is.

Az azonos csoportokba tartozó adatokat ezután összesítettük, átlagoltuk, illetve meghatároztuk a szórásukat is. Az egészséges és pikkelysömörös tünetmentes epidermális keratinocita sejtek adatai közötti különbségek meghatározásához kétmintás T-próbát használtuk (Microsoft Excel). Az eredményt szignifikánsnak tekintettük  $p \leq 0,05$  esetén.

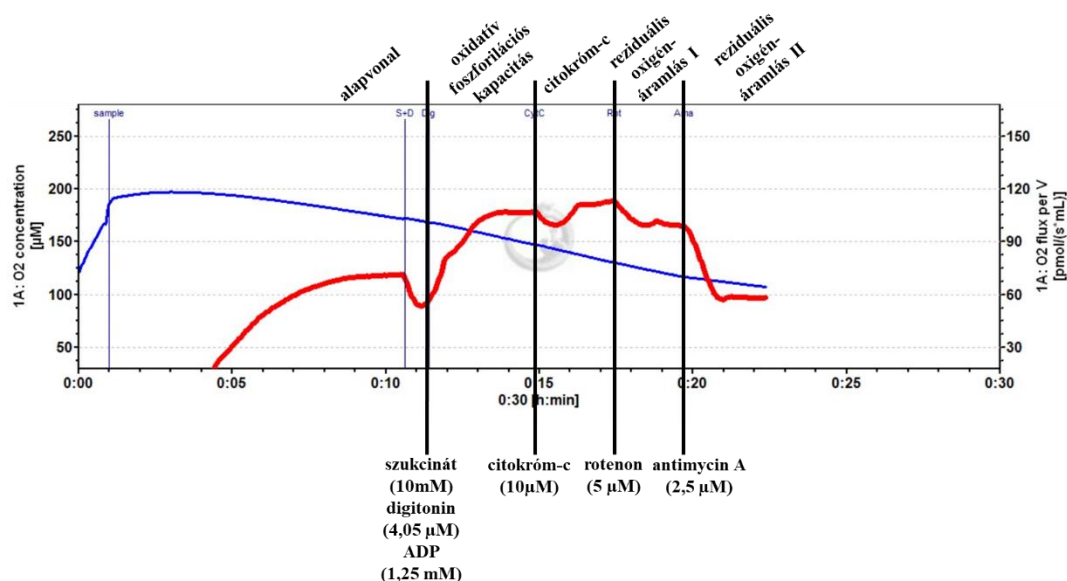
## V. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESLÉK

### 1. MITOKONDRIÁLIS FUNKCIÓBELI ELTÉRÉSEK A PIKKELYSÖMÖRÖS TÜNEMENTES KERATINOCITÁKBAN

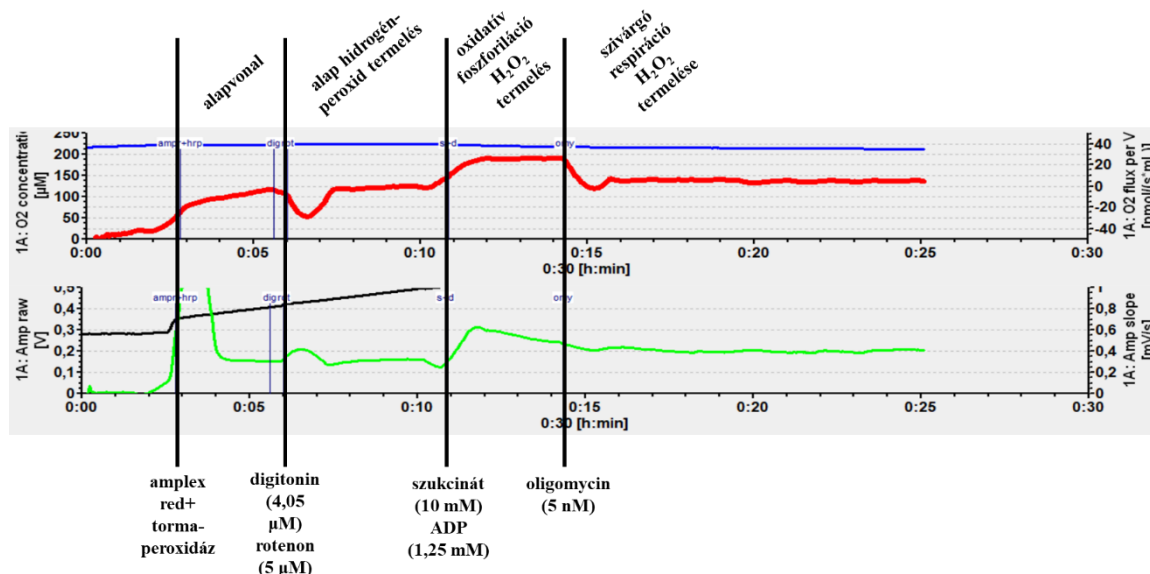
Az anyagok és módszerek 3. pontjában részletezett protokollok beállítását először HaCaT keratinocita sejtvonal felhasználásával végeztük el. Ezt követően primer, egészséges bőrből származó keratinocita sejteken teszteltük a beállított légzési lánc aktivitás mérési (6. ábra), citokróm-c felszabadulás mérési (7. ábra), és  $H_2O_2$  termelés mérési (8. ábra) protokollokat, melyekről 1-1 reprezentatív ábra látható.



6. ábra: Reprezentatív légzési lánc aktivitás mérés primer egészséges keratinociták felhasználásával



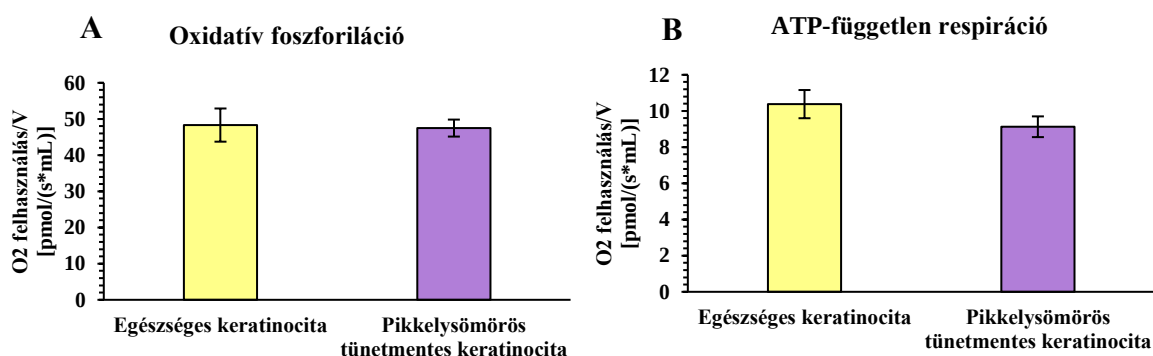
7. ábra: Reprezentatív citokróm-c felszabadulás mérés primer egészséges keratinociták felhasználásával

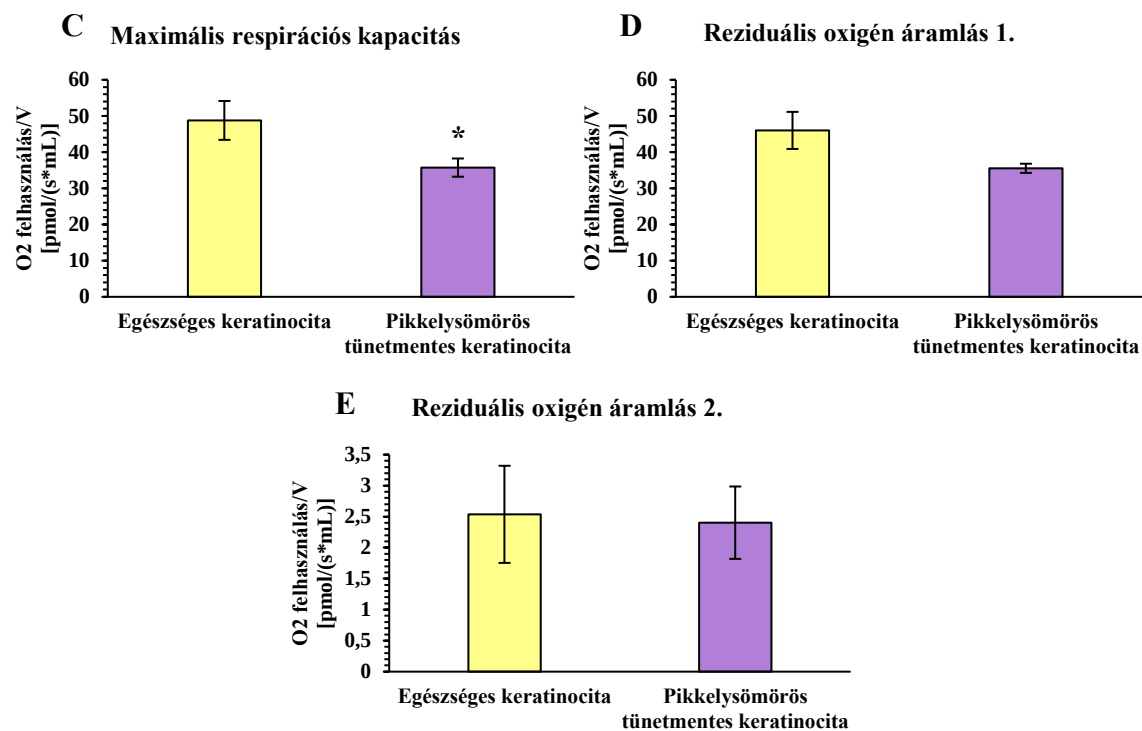


8. ábra: Reprezentatív hidrogén-peroxid felszabadulás mérés primer egészséges keratinociták felhasználásával

### 1.1. LÉGZÉSI LÁNC ELTÉRÉSEI

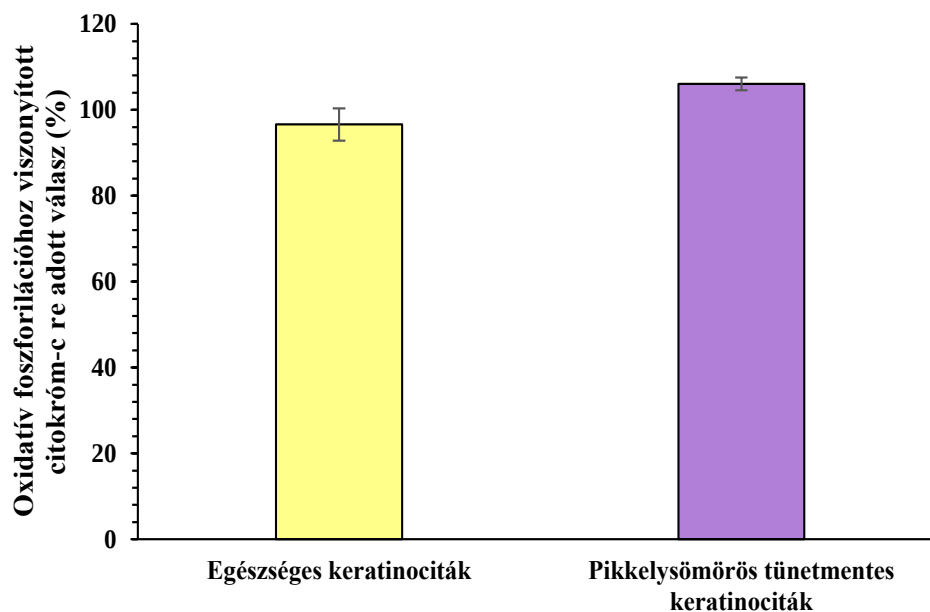
A mérés során azt tapasztaltuk, hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőrből származó keratinociták (n=4) alap légzési aktivitása, illetve az oxidatív foszforilációja nem tér el szignifikánsan az egészséges keratinocitákétól (n=4). Ezt követően mértük az ATP független respirációt az oligomycin hozzáadásával, amelyben szintén nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a tünetmentes keratinocitákban az egészséges sejtekhez képest. Azonban a maximális mitokondriális repirációs kapacitás mérésére szolgáló CCCP kémiai szétkapcsolószert hozzáadását követően alacsonyabb oxigénáramlás volt megfigyelhető a tünetmentes keratinocitákban. Eredményeink arra utalnak, hogy a mitokondriális légzési lánc kapcsoltsága alacsonyabb mértékű a tünetmentes sejtekben, így a szétkapcsoló szerre tehát kevésbé voltak képesek reagálni. Ezt követően a reziduális oxigén áramlás mérésekor nem találtunk különbséget az egészséges és a pikkelysömörös tünetmentes keratinociták között.





9. ábra: Az O<sub>2</sub> felhasználás térfogategységenként egészséges és pikkelysömörös tünetmentes keratinocitákban,  $\pm$  SEM; n=5 egészséges, n=4 pikkelysömörös tünetmentes donor; C: \*:  $p \leq 0,05$ , kétmintás T-próba

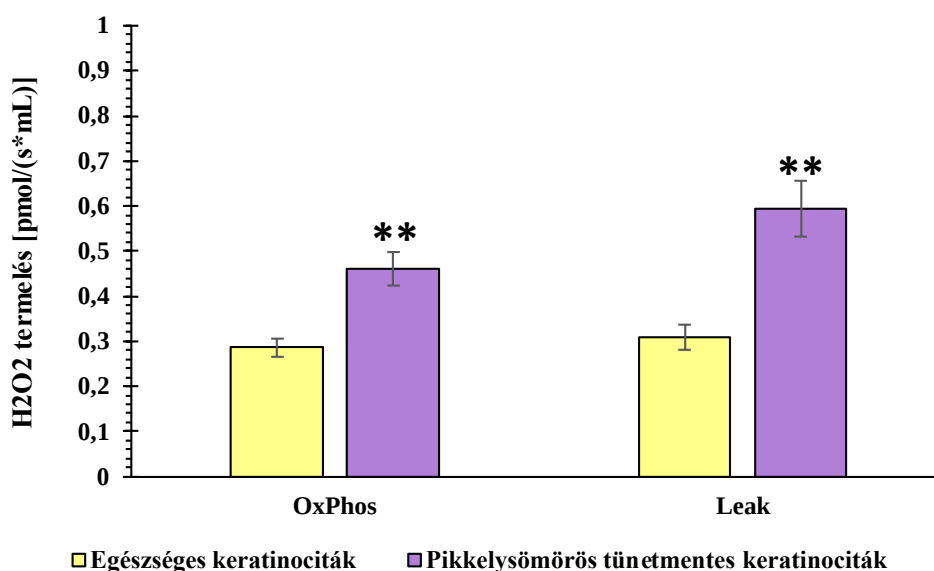
## 1.2. CITOKRÓM-C FELSZABADULÁS KÜLÖNBSÉGEI



10. ábra: Oxidatív foszforilációhoz viszonyított citokróm-c válasz %-os aránya egészséges és pikkelysömörös tünetmentes keratinocitákban,  $\pm$  SEM; n=4 egészséges, n=4 pikkelysömörös tünetmentes donor, kétmintás T-próba

Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján a citokróm-c magasabb szinten volt azonosítható a pikkelysömörös tünetmentes punch biopsziákban az egészségeshez képest, ezért összehasonlítottuk az egészséges és tünetmentes keratinocita sejtek citokróm-c felszabadulását a módszerek fejezet 3.2. pontban leírt protokollja alkalmazásával. A mérés során a sejtek oxidatív foszforilációja során mért oxigénáramláshoz viszonyítva magasabb értéket kaptunk citokróm-c hozzáadására a tünetmentes keratinociták esetén (n=4), amely statisztikailag szignifikáns közeli értéket mutatott az egészséges sejtekhez képest (n=4). A citokróm-c-re adott magasabb arányú oxigénáramlás potenciális membránkárosodásra utal a tünetmentes keratinocitákban, valamint a tünetmentes keratinociták hozzájárulhatnak a citokróm-c magasabb szintű megjelenéséhez a tünetmentes bőrben.

### 1.3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> TERMELÉSI KÜLÖNBSÉGEK

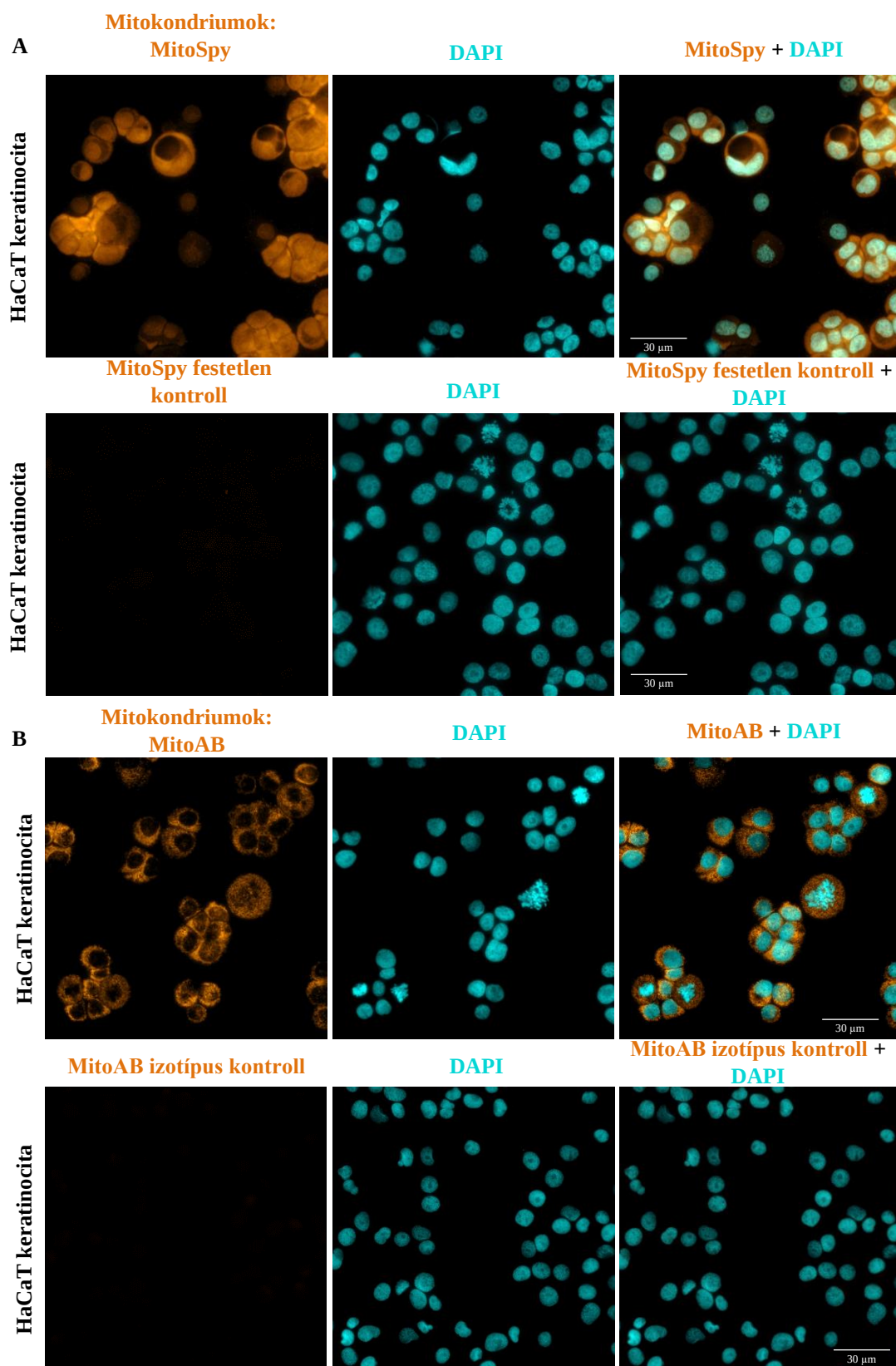


11. ábra: Hidrogén-peroxid termelés egészséges és pikkelysömörös tünetmentes keratinocitákban,  $\pm$  SEM; n=4 egészséges, n=4 pikkelysömörös tünetmentes donor, \*\*:  $p \leq 0,01$ , egyszempontos ANOVA

A légzési lánc aktivitásának és a citokróm-c felszabadulásának mérése mellett az Oroboros O2k rendszerben összehasonlítottuk a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mint ROS termelésének mértékét is az egészséges (n=4) és a pikkelysömörös tünetmentes epidermális keratinociták (n=3) között. A tünetmentes keratinociták H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelése az oxidatív foszforiláció és a szivárgó respiráció során is szignifikánsan magasabb volt az egészséges keratinocitákhoz képest. Az oxidatív foszforiláció során reaktív oxigéngyökök szabadulnak fel, melyek mértéke nagyobb lehet a tünetmentes sejtekben. Az eredmények alapján vagy több mitokondrium van a pikkelysömörös keratinocitákban, vagy ezek a mitokondriumok jelentősen több reaktív oxigéngyököt termelnek valamilyen károsodás miatt.

## 2. IMMUNFLUORESZCENS MITOKONDRIUM JELÖLÉSEK SORÁN TAPASZTALT ELTÉRÉSEK

### 2.1. FESTÉS OPTIMALIZÁLÁSI EREDMÉNYEK

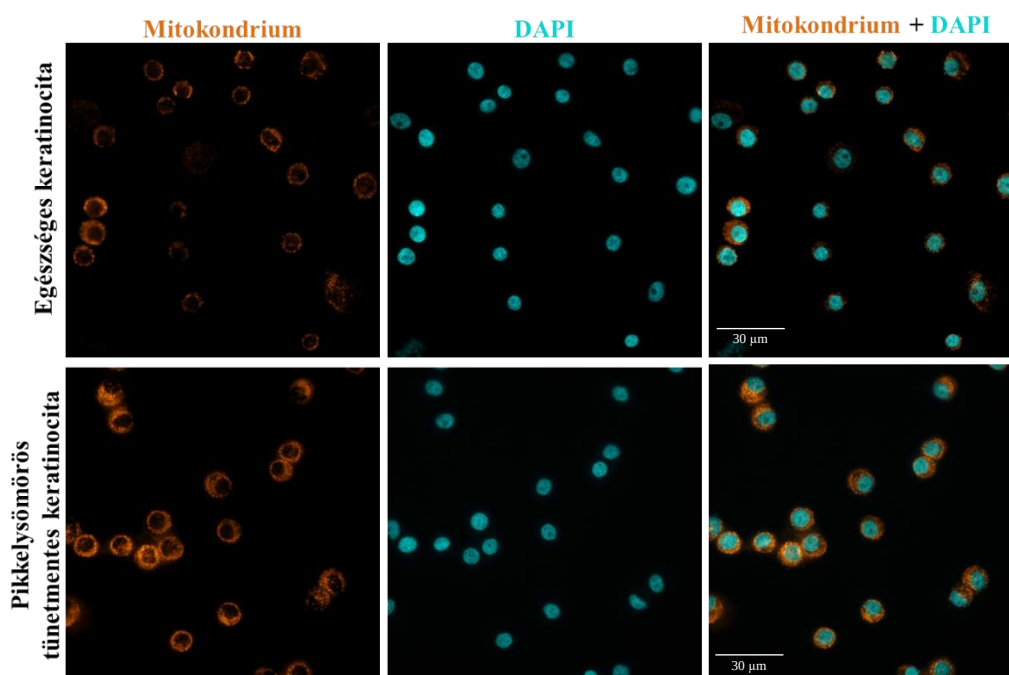


12. ábra: HaCaT keratinocita sejtek MitoSpy és mitokondrium jelölő antitest festése, reprezentatív képek, 40x-es nagyítás

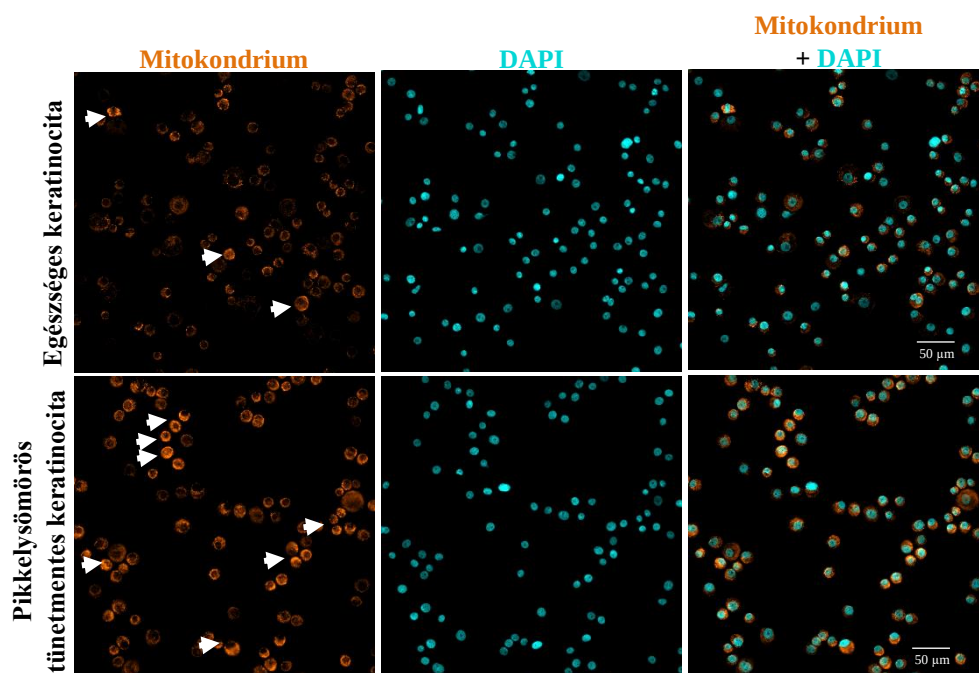
A mitokondriális funkciók mérése mellett a mitokondriumok jelölésére immunfluoreszens jelölési technikát alkalmaztunk. A festéseket a módszerek fejezet 4. pontjában leírt sejtcentrifugálási módszerrel készített mintákon végeztük. A festések optimalizálását szintén HaCaT keratinocita sejtek felhasználásával végeztük a módszerek fejezet 5. pontja alapján a direkt és indirekt immunfluoreszcencia technika alkalmazásával. Mindkét módszert sikeresen beállítottuk a HaCaT sejteken (12. ábra), majd teszteltük egészséges keratinocita sejteken. Megfigyeltük mindkét festési technika esetén, hogy a kultúrában voltak sejtek, melyek intenzívebben festődtek, és voltak kevésbé intenzívek, ami arra utal, hogy több-, ill. kevesebb lehet ezekben a sejtekben a mitokondriumok mennyisége, ill. eltérő lehet a sejtek állapota, és az eltérő állapotú sejtekben különbségek lehetnek a mitokondriumok mennyiségében. Az indirekt módszer mikroszkópos képe alapján a mitokondriumok mintázata jobban kivehető volt, ezért ezt a módszert választottuk ki a mitokondriális funkciók mérése során alkalmazott sejtek citospin preparátumainak festésére. A beállított direkt immunfluoreszcens módszert pedig további kettős jelölésekre fogjuk felhasználni.

## 2.2. MITOKONDRIUM FESTŐDÉSBELI ELTÉRÉSEK AZ EGÉSZSÉGES ÉS A PIKKELYSÖMÖRÖS TÜNETMENTES KERATINOCITÁK KÖZÖTT

Az indirekt módszerrel megjelöltük  $n=6$  egészséges és  $n=4$  pikkelysömörös donor tünetmentes epidermiszből származó keratinociták mitokondriumait (13. és 14. ábra).

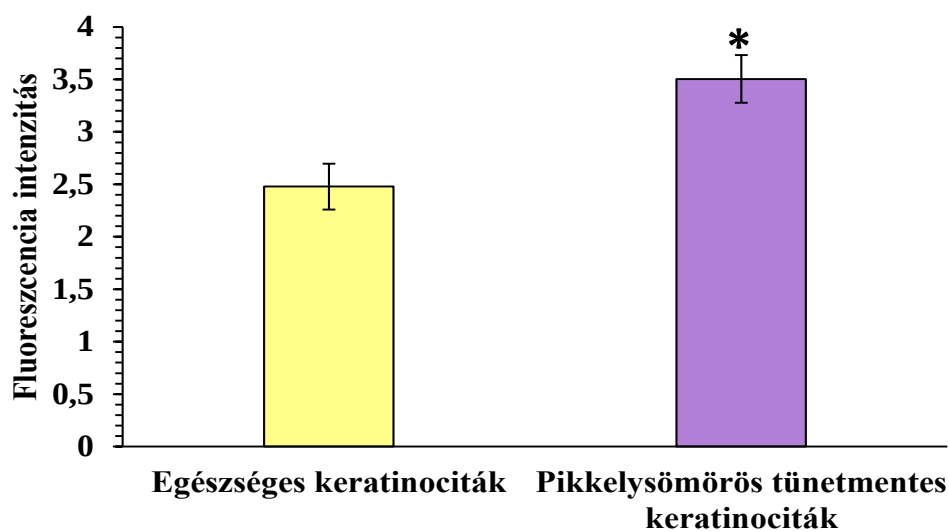


13. ábra: Egészséges és pikkelysömörös tünetmentes keratinociták indirekt festése,  $n=6$  egészséges,  $n=4$  pikkelysömörös tünetmentes donor, reprezentatív képek, 40x-es nagyítás

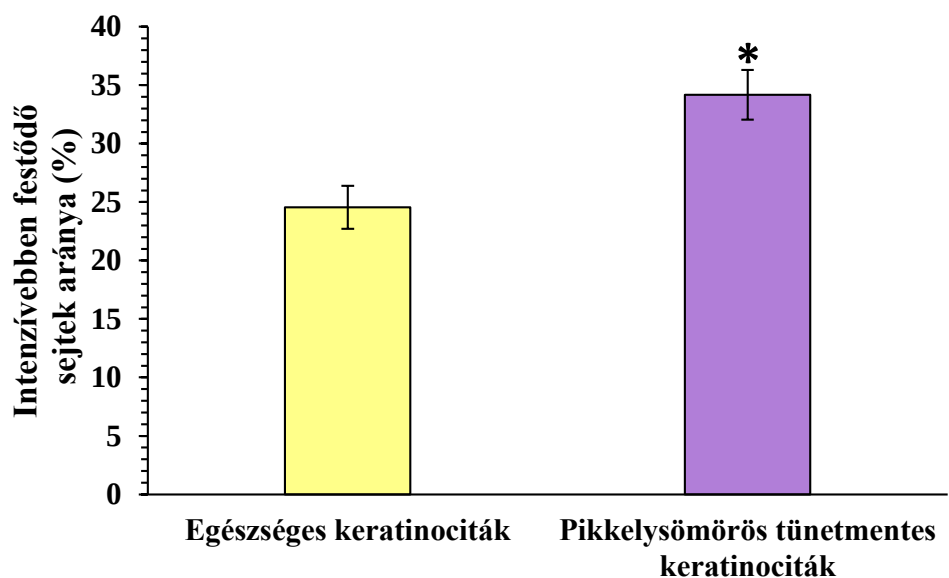


14. ábra: Egészséges és pikkelysömörös tünetmentes keratinociták indirekt festése,  $n=6$  egészséges,  $n=4$  pikkelysömörös tünetmentes donor, reprezentatív képek, 20x-os nagyítás; nyilak: intenzívebben festődő sejtek

Megfigyeltük, hogy a tünetmentes keratinociták festési intenzitása magasabb volt az egészséges sejtekéhez képest. A festések fluoreszcencia intenzitását is meghatároztuk, amely alapján a tünetmentes keratinociták festési mintázata szignifikánsan magasabb volt (15. ábra). Már a HaCaT sejtek esetén is megfigyeltünk a kultúrán belül intenzitásbeli eltéréseket, melyek szintén jelen voltak a primer egészséges és pikkelysömörös tünetmentes keratinocita kultúrákban is. Megfigyeltük, hogy az intenzívebben festődő sejtek aránya magasabb volt a tünetmentes kultúrában, ezért meghatároztuk az intenzíven festődő sejtek számát is az összsejtszámhoz viszonyítva. A tünetmentes tenyészetekből származó mintákban szignifikánsan magasabb volt a fluoreszcencia intenzitás mellett az intenzíven festődő sejtek aránya is (16. ábra), amely hozzájárul a magasabb intenzitás értékekhez is.



15. ábra: Fluoreszcencia intenzitás egészséges és pikkelysömörös tünetmentes keratinocitákban,  $\pm$  SEM;  $n=6$  egészséges,  $n=4$  pikkelysömörös tünetmentes donor, \*:  $p \leq 0,05$ , kétmintás T-próba



16. ábra: Intenzívebben festődő sejtek százalékos aránya egészséges és pikkelysömörös tünetmentes keratinocitákban,  $\pm$  SEM;  $n=6$  egészséges,  $n=4$  pikkelysömörös tünetmentes donor, \*:  $p \leq 0,05$ , kétmintás T-próba

Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy a tünetmentes keratinocitákban magasabb lehet a mitokondriumok száma, és több olyan sejt lehet a kultúrában, melyekben több a mitokondrium.

## VI. ÖSSZEFOGLALÁS

A pikkelysömör a lakosság 1-3%-át érintő, krónikus gyulladásos bőrbetegség, ahol a betegek egészséges megjelenésű, tünetmentes bőrterületein a betegségre hajlamosító tényezők, vagy éppen ellenkezőleg, a nem-léziós állapot fenntartását célzó elváltozások is megjelenhetnek. Ismert, hogy a tünetmentes bőr epidermális keratinocitái stresszhatásokkal szemben fokozott érzékenységet mutatnak. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai arra utalnak, hogy a tünetmentes bőrben megváltozott kifejeződést mutató sejt-stressz folyamatokhoz köthető fehérvék érinthetik a mitokondriális funkciókat.

Munkánk során ezért célul tűztük ki mitokondriális folyamatok összehasonlítását a pikkelysömörös tünetmentes és az egészséges bőr epidermális keratinocitái között.

A mitokondriális funkciók (oxidatív foszforiláció, citokróm-c felszabadulás, hidrogén-peroxid termelés) vizsgálatához először HaCaT keratinocita sejtvonal alkalmazásával optimalizálási kísérleteket végeztünk nagy felbontású respirométerrel (Oroboros O2k oxygraph). Ezt követően az egészséges donorok és pikkelysömörös betegek tünetmentes bőrterületeiről származó epidermális keratinocitákra alkalmaztuk az optimalizált módszereket. Ezzel párhuzamosan citospin preparátumokon immunfluoreszcens technikával megjelöltük a mitokondriumokat, és meghatároztuk a festés fluoreszcencia intenzitását.

A pikkelysömörös tünetmentes keratinociták mitokondrium festésének fluoreszcencia intenzitása, és az intenzívebben festődő sejtek aránya is szignifikánsan magasabb volt az egészséges keratinocitákhoz képest. Oxidatív foszforilációban és citokróm-c felszabadulásban nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget, azonban szignifikáns közeli emelkedést láttunk a citokróm-c hozzáadását követően az oxigénáramlásban a tünetmentes keratinocita sejtek esetén, ami közvetett módon utalhat potenciális membránkárosodásra. Azonban a tünetmentes keratinociták CCCP-re (oxidatív foszforiláció szétkapcsoló) adott válasza szignifikánsan csökkent volt, tehát a mitokondriális légzési lánc kapcsoltsága alacsonyabb mértékű lehet a tünetmentes sejtekben. Az oxidatív foszforiláció és „leak” azaz szivárgó respiráció során mért hidrogén-peroxid termelése pedig szignifikánsan magasabb volt tünetmentes keratinocitáknak az egészséges keratinocitákhoz képest. Mivel a reaktív oxigéngyökök az oxidatív foszforiláció során szabadulnak fel, ennek mértéke nagyobb lehet a tünetmentes sejtekben. Eredményeink arra utalnak, hogy a pikkelysömörös betegek tünetmentes bőréből származó keratinocitákban eltérő a mitokondriális funkció az egészséges keratinocitákhoz viszonyítva. Magasabb a mitokondriumok száma, és több olyan sejt lehet a kultúrában, melyekben több a mitokondrium, ami fokozott mitokondriális biogenezisre utal - összhangban korábbi eredményeinkkel. A

mitokondriumokban továbbá potenciális membránkárosodás lehet, és megváltozik a mitokondriumok kapcsoltsága, ami hozzájárulhat a magasabb hidrogén-peroxid termeléshez. Ezek az elváltozások potenciális mitokondriális diszfunkciók lehetnek, melyek befolyásolhatják a tünetmentes keratinociták stresszhatásokkal szembeni érzékenységét. További vizsgálatainkkal arra keresünk választ, vajon a megfigyelt mitokondriális különbségek kompenzációs mechanizmusként működhetnek-e a pikkelysömörös tünetmentes bőr egészséges megjelenésű, nem-léziós állapotának fenntartására, vagy épp ellenkezőleg, a gyulladásos megbetegedésekhez hasonlóan a mitokondriális diszfunkciók már a tünetmentes bőrben is megjelenhetnek, mint a léziók kialakítására hajlamosító elváltozások.

## VII. IRODALOMJEGYZÉK

- Sarah E. J. Bowman és Kara L. Bren. 2008. „The Chemistry and Biochemistry of Heme c: Functional Bases for Covalent Attachment”. *Natural Product Reports* 25 (6): 1118. <https://doi.org/10.1039/b717196j>.
- Renáta Bozó, Judit Danis, Lili Borbála Flink, Dániel László Vidács, Lajos Kemény és Zsuzsanna Bata-Csörgő. 2021. „Stress-Related Regulation Is Abnormal in the Psoriatic Uninvolved Skin”. *Life* 11 (7): 599. <https://doi.org/10.3390/life11070599>.
- Maria Sole Chimenti, Flavia Sunzini, Laura Fiorucci, Elisabetta Botti, Giulia Lavinia Fonti, Paola Conigliaro, Paola Triggianese és mtsai. 2018. „Potential Role of Cytochrome c and Tryptase in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis: Focus on Resistance to Apoptosis and Oxidative Stress”. *Frontiers in Immunology* 9 (október): 2363. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02363>.
- Clinical Dermatology*. 2008. 4th ed. Malden, Mass: Blackwell publ.
- R. Corrocher, S. Ferrari, M. de Gironcoli, A. Bassi, O. Olivieri, P. Guarini, A. Stanzial, A. L. Barba és L. Gregolini. 1989. „Effect of Fish Oil Supplementation on Erythrocyte Lipid Pattern, Malondialdehyde Production and Glutathione-Peroxidase Activity in Psoriasis”. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 179 (2): 121–31. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(89\)90158-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(89)90158-7).
- Feichtinger René G., Daniel Neureiter, Johannes A. Mayr, Franz A. Zimmermann, Frank Berthold, Neil Jones, Wolfgang Sperl és Barbara Kofler. 2011. „Loss of Mitochondria in Ganglioneuromas”. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)* 3 (1): 179–86. <https://doi.org/10.2741/e231>.
- Feichtinger René G., Wolfgang Sperl, Johann W. Bauer, és Barbara Kofler. 2014. „Mitochondrial Dysfunction: A Neglected Component of Skin Diseases”. *Experimental Dermatology* 23 (9): 607–14. <https://doi.org/10.1111/exd.12484>.
- T. G. Frey és C. A. Mannella. 2000. „The Internal Structure of Mitochondria”. *Trends in Biochemical Sciences* 25 (7): 319–24. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01609-1](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01609-1).
- Gabr Sami A. és Ahmad H. Al-Ghadir. 2012. „Role of Cellular Oxidative Stress and Cytochrome c in the Pathogenesis of Psoriasis”. *Archives of Dermatological Research* 304 (6): 451–57. <https://doi.org/10.1007/s00403-012-1230-8>.
- Neeta R Gookhale, Vasudha A Belgaumkar, Dakshayani P Pandit, Shantanu Deshpande és Dhananjay K Damle. 2005. „A Study of Serum Nitric Oxide Levels in Psoriasis”. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology* 71 (3): 175. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.16232>.
- B. Gubán, K. Vas, Z. Balog, M. Manczinger, A. Bebes, G. Groma, M. Széll, L. Kemény és Zs. Bata-Csörgő. 2016. „Abnormal Regulation of Fibronectin Production by Fibroblasts in Psoriasis”. *British Journal of Dermatology* 174 (3): 533–41. <https://doi.org/10.1111/bjd.14219>.
- Naohito Hatta, Minoru Takata, Shigeru Kawara, Takae Hirone és Kazuhiko Takehara. 1997. „Tape Stripping Induces Marked Epidermal Proliferation and Altered TGF- $\alpha$  Expression in Non-Lesional Psoriatic Skin”. *Journal of Dermatological Science* 14 (2): 154–61. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(96\)00567-1](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(96)00567-1).
- Kárpáti Sarolta és Kemény Lajos; 2013. *Bőrgyógyászat és venerológia*. Budapest: Medicina Könyvkiadó.
- Evelyn Kelemen, Renáta Bozó, Gergely Groma, Zsuzsanna Bata-Csörgő, Lajos Kemény, Judit Danis és Márta Széll. 2021. „The Psoriatic Nonlesional Skin: A Battlefield between Susceptibility and Protective Factors”. *Journal of Investigative Dermatology* 141 (12): 2785–90. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.05.020>.

- H. Klug és P. Schulze. 1988. „Unusual Mitochondrial Reaction in Psoriatic Keratinocytes”. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology* 56 (1): 201–3. <https://doi.org/10.1007/BF02890018>.
- T. Kobayashi, M. Matsumoto, H. Iizuka, K. Suzuki és N. Taniguchi. 1991. „Superoxide Dismutase in Psoriasis, Squamous Cell Carcinoma and Basal Cell Epithelioma: An Immunohistochemical Study”. *The British Journal of Dermatology* 124 (6): 555–59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1991.tb04950.x>.
- Michelle A. Lowes, Mayte Suárez-Fariñas és James G. Krueger. 2014. „Immunology of Psoriasis”. *Annual Review of Immunology* 32: 227–55. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120225>.
- Deirdre Nolfi-Donagan, Andrea Braganza és Sruti Shiva. 2020. „Mitochondrial Electron Transport Chain: Oxidative Phosphorylation, Oxidant Production, and Methods of Measurement”. *Redox Biology* 37 (október): 101674. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>.
- Audrey Nosbaum, Karima Dahel, Catherine Goujon, Jean-François Nicolas, Valérie Mengeaud és Marc Vocanson. 2021. „Psoriasis is a disease of the entire skin: non-lesional skin displays a prepsoriasis phenotype”. *European Journal of Dermatology* 31 (2): 143–54. <https://doi.org/10.1684/ejd.2021.4015>.
- Jodi Nunnari és Anu Suomalainen. 2012. „Mitochondria: In Sickness and in Health”. *Cell* 148 (6): 1145–59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>.
- Pei Qiao, Wei Guo, Yao Ke, Hui Fang, Yuchen Zhuang, Man Jiang, Jieyu Zhang, és mtsai. 2019. „Mechanical Stretch Exacerbates Psoriasis by Stimulating Keratinocyte Proliferation and Cytokine Production”. *The Journal of Investigative Dermatology* 139 (7): 1470–79. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.12.019>.
- Enikő Sonkoly, Zsuzsanna Bata-Csörgő, Andor Pivarcsi, Hilda Polyanka, Anna Kenderessy-Szabó, Gergely Molnár, Károly Szentpáli és mtsai. 2005. „Identification and Characterization of a Novel, Psoriasis Susceptibility-Related Noncoding RNA Gene, PRINS”. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (25): 24159–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501704200>.
- Annapoorna Sreedhar, Leopoldo Aguilera-Aguirre, és Keshav K. Singh. 2020. „Mitochondria in Skin Health, Aging, and Disease”. *Cell Death & Disease* 11 (6): 444. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2649-z>.
- Edit Szél, Renáta Bozó, Éva Hunyadi-Gulyás, Máté Manczinger, Kornélia Szabó, Lajos Kemény, Zsuzsanna Bata-Csörgő, és Gergely Groma. 2019. „Comprehensive Proteomic Analysis Reveals Intermediate Stage of Non-Lesional Psoriatic Skin and Points out the Importance of Proteins Outside This Trend”. *Scientific Reports* 9 (1): 11382. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47774-5>.
- Anastasia Therianou, Magdalini Vasiadi, Danae A. Delivanis, Theodora Petrakopoulou, Alexandra Katsarou-Katsari, Christina Antoniou, Alexandros Stratigos, és mtsai. 2019. „Mitochondrial Dysfunction in Affected Skin and Increased Mitochondrial DNA in Serum from Patients with Psoriasis”. *Experimental Dermatology* 28 (1): 72–75. <https://doi.org/10.1111/exd.13831>.
- H. Wang. 2006. „Activated Macrophages Are Essential in a Murine Model for T Cell-Mediated Chronic Psoriasiform Skin Inflammation”. *Journal of Clinical Investigation* 116 (8): 2105–14. <https://doi.org/10.1172/JCI27180>.
- G. Weiss, A. Shemer, és H. Trau. 2002. „The Koebner Phenomenon: Review of the Literature”. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV* 16 (3): 241–48. <https://doi.org/10.1046/j.1473-2165.2002.00406.x>.

Bodi Zhang, Konstantinos-Dionysios Alysandratos, Asimenia Angelidou, Shahrzad Asadi, Nikolaos Sismanopoulos, Danae-Anastasia Delivanis, Zuyi Weng, és mtsai. 2011. „Human Mast Cell Degranulation and Preformed TNF Secretion Require Mitochondrial Translocation to Exocytosis Sites: Relevance to Atopic Dermatitis”. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (6): 1522-1531.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.005>.

## VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni Dr. Kemény Lajos Professzor Úrnak és Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsannának, hogy dolgozatomat a Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikáján készíthettem.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Bozó Renátának, hogy szaktudásával segítette munkámat, valamint a rám fordított időt, figyelmet, türelmet és hasznos tanácsokat.

Köszönöm Dr. Huliák Ildikó belső konzulensi tevékenységét.

Köszönet illeti továbbá az SZTE SZAOK Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika Sejtbiológia Laboratóriumának munkatársait, különösen köszönöm Flink Lili Borbála PhD hallgatónak és Kohajda Mónika laboratóriumi asszisztensnek a segítségét.

Köszönjük az SZTE SZAOK Sebészeti és Műtéttani Intézet és az SZTE SZAOK Traumatológiai Klinika munkatársainak, név szerint Dr. Hartmann Petra, Dr. Baráth Bálint, Sándor Lilla, Mester Csilla, Dr. Jász Dávid Kurszán, Dr. Illésné Horváth Tamara, Prof. Dr. Boros Mihály és Donka Tibor mitokondriális funkciómérések biztosításában és a mérések során nyújtott segítségüket és hasznos tanácsaikat.

Köszönöm az SZTE SZAOK bőrminta vételben résztvevő orvosainak (Dr. Kui Róbert, Dr. Belső Nóra, Dr. Nagy Géza Róbert, Pikkelysömör Ambulancia dolgozói, Plasztikai Sebészeti Osztály dolgozói) közreműködését.

Köszönöm az Innovációs és Technológiai Minisztérium, Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs alap, Új Nemzeti Kiválóság Programjának ÚNKP-22-1-SZTE-217 kódszámú ösztöndíját.

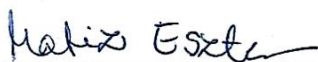
## IX. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

### TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Matiz Eszter nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott Potenciális mitokondriális diszfunkciók a pikkelysömörös tünetmentes bőr keratinocitáiban című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

| Részfeladat                                                                                   | A részvétel mértéke<br>(ötfokozatú skálán <sup>#</sup> jellemezve) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| HaCat keratinocita sejtvonal tenyésztése                                                      | 5                                                                  |
| Keratinocita izolálás egészséges bőrből                                                       | 3                                                                  |
| Egészséges és pikkelysömörös tünetmentes keratinocita sejtvonal tenyésztése                   | 5                                                                  |
| Citospin minták készítése                                                                     | 4                                                                  |
| Fluoreszcens mitokondrium festések és mikroszkópos felvételek készítése                       | 4                                                                  |
| Részvétel a mitokondriális funkciók mérésében az SZTE SZAOK Sebészeti és Műtéttani Intézetben | 1                                                                  |
| részvétel a kísérleti eredmények kiértékelésében                                              | 3                                                                  |
| szakirodalom áttekintése, előadás és dolgozat összeállítása                                   | 4                                                                  |

Kelt: SZEGED, 2022. 11. 08.



Matiz Eszter

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Dr. Bozó Renáta, SZTE SZAOK Bőrgyógyászati és  
Allergológiai Klinika