

**Egy vörösbőr komponens hatása az
LPS-indukálta gyulladási
folyamatokra *in vivo* és *in vitro***

PhD tézis

Tucsek Zsuzsanna



Ph. D. Programvezet : Prof. Dr. Sümegei Balázs, D. Sc.

Témavezet : Dr. Veres Balázs, Ph. D.

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

2011.

Rövidítések

AP-1, aktivátor protein-1, **CAT**, kataláz, **COX-2**, ciklooxygenáz-2, **DSP**, kettős specificitású protein foszfatáz, **ELAM**, endotél-leukocita adhéziós molekula, **ERK1/2**, extracelluláris szignál-regulált kináz, **FA**, ferulaldehid, **GSHPx**, glutation-peroxidáz, **GSSGR**, glutation-reduktáz, **HMGB-1**, nagy mobilitású csoport-1, **ICAM**, intercelluláris adhéziós molekula, **IFN- γ** , interferon- γ , **IKK**, I B kináz, **IL**, interleukin, **iNOS**, indukálható NO-szintáz, **JNK**, c-Jun N-terminális kináz, **LBP**, LPS-kötő fehérje, **LPS**, lipopoliszacharid, **M3K**, MKK kináz, **MAPK**, mitogén aktivált protein kináz, **MKK**, MAPK kináz, **MKP**, MAP kináz foszfatáz, **NF- κ B**, nukleáris faktor- κ B, **NO**, nitrogén-monoxid, **PAMP**, patogénhez köthető molekuláris mintázat, **PI-3K**, foszfatidilinozitol-3 kináz, **PRR**, patogénmintázat felismerő receptor, **RNS**, reaktív nitrogén származék, **ROS**, reaktív oxigén származék, **SAPK**, stressz-aktivált protein kináz, **SIRS**, szisztémás gyulladásos válasz szindróma, **SOD**, szuperoxid-dizmutáz, **TLR**, toll-szerű receptor, **TNF- α** , tumor nekrozis faktor- α , **VCAM**, vaszkuláris sejt adhéziós molekula

Bevezetés

Sepszis és septicus sokk

Az immunrendszer szabályozó folyamatainak legfontosabb szerepe a szövetek védelme és károsodása közti egyensúly fenntartása. A különböző kórokozók és klinikai behatások következtében kialakuló szisztémás gyulladásos válasz szindróma (SIRS) és a sepszis, a gyulladásos válaszreakciók feletti kontroll elvesztésével jellemezhető. Ebben az esetben előforduló jellegzetes klinikai tünetek a hiper- vagy hipotermia, emelkedett szívfrekvencia (tahikardia) és légzésszám (tachipnea), illetve a leukocitopénia vagy leukocitózis. Súlyos sepszis esetében a fent említett tünetek több szervre kiterjedő működési zavarral, szisztémás hipotenzióval, metabolikus acidózissal, oliguriával, emelkedett májenzim szintekkel és akut elmeállapot változással járnak együtt. Míg a súlyos sepszis egy kevésbé akut, 30-70 %-os halálozási rátával bíró tünetegyüttes, addig a septicus sokk szindróma az alkalmazott folyadékterápia ellenére fennálló hipotenzióval jellemezhető, kialakulásától számítva 24-48 órán belül halállal végződő kardiovaszkuláris sokk. A jelenleg alkalmazott

leghatékonyabb széles spektrumú antibiotikum és immunszuppresszív terápia ellenére a szepszis még mindig az intenzív osztályokon elforduló leggyakoribb halálokok egyike, melyben évente 18 millió ember érintett világszerte.

LPS jelátvitel

Szepszisben a fertőzésre reagáló, és a szervezet veleszületett immunválaszában szerepet játszó limfociták, monociták és makrofágok szabályozatlan, fokozott válaszreakciói figyelhetők meg. A különböző immunsejtek, patogénmintázat felismerő receptoraik (PRRs) által, igen fontos szerepet játszanak a kórokozók azonosításában. A genetikailag kódolt receptorok (pl. toll-szerű receptor, TLR) patogénhez köthető molekuláris mintázatot (PAMP) (pl. a Gram-negatív baktériumok lipopoliszacharid molekulája (LPS)) ismernek fel. Az LPS-kötő fehérje (LBP) – LPS komplex, makrofágok és monociták CD14-MD2-TLR4 sejt felszíni receptoraihoz kötődve különböző jelátviteli útvonalakat indukál, úgymint I κ B-kináz (IKK)/nukleáris faktor (NF)- κ B, mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) és foszfatidilinozitol-3-kináz (PI-3K)/Akt útvonalakat. Ezen jelátviteli útvonalak számos transzkripciós faktor (pl. NF- κ B (p50/p65), aktivátor-protein-1 (AP-1, c-Fos/c-Jun)) aktiválásán keresztül serkentik a proinflammatorikus citokinek és kemokinek (tumor nekrosis faktor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interleukin-12 (IL-12), nagy mobilitású csoport-1 (HMGB-1) stb.) termelését, fokozzák a ciklooxygenáz-2 (COX-2) és indukálható NO-szintáz (iNOS) expresszióját és különböző sejtadhéziós molekulákat (intercelluláris adhéziós molekulák (ICAM), endotél-leukocita adhéziós molekulák (ELAM, E-szelektin), platelet endotél-sejt adhéziós molekula-1 (P-szelektin), vaszkuláris sejt adhéziós molekulák (VCAM)) aktiválnak. A COX és iNOS enzimek megnövekedett expressziójának eredményeképpen reaktív oxigén-származékok (ROS) és nitrogén-monoxid (NO) képződik, melyek a termelődött gyulladáscsökkentő citokinekkel és adhéziós molekulákkal együtt az endotél és epitél sejtek folyamatos stimulációját okozva, újabb NF- κ B-aktiválódást idéznek elő. Ez a pozitív visszacsatolási rendszer az immunválaszt felértékelve szisztémás gyulladáshoz, endotél-funkciózavarhoz és szervi károsodáshoz vezet.

MAPK jelátvitel, MKP-1

A MAPK-útvonalak, úgymint extracelluláris szignál-regulált kináz (p42/44 MAPK vagy ERK1/2), p38-kináz és stressz-aktivált protein-kináz/c-Jun N-terminális kináz (SAPK/JNK) fontos szerepet játszanak a szervezet immunreakcióiban. A citoszolikus, nukleáris vagy mitokondriális kompartmentekben jelenlévő MAPK-okat MAPK-kinázok

(MAPKK), azokat pedig a MAPKK kinázok (MAPKKK) aktiválják. Míg a MAPK-ok aktivációja a patogének eliminálására irányuló immunválasz fenntartásában vesz részt, túlzott aktivációjuk sejt- és szövetkárosodáshoz vezethet. Ezen útvonalak gátlásával lehet segítség nyílni az immunreakciók erőségének és időbeni lefutásának szabályozására, így a károsodás megakadályozására. A MAPK foszfatázoknak (MKP) központi szerepük van a veleszületett immunválasz féken tartásában, így a fertőzés okozta szeptikus sokk szindróma megelőzésében. Emlős sejtekben a MKP-ok, vagy más néven kettős specificitású (tirozin és szerin/treonin) protein foszfatázok (DSP) felelősek elsősorban a MAPK-ok defoszforilációjáért, azaz deaktivációjáért. Emlős sejtekben jelenleg 11 MKP-t azonosítottak, melyek közül az elsőként felfedezett MKP-1 bír MAPK-szelektív foszfatáz aktivitással. Az MKP-1 tehát egy alapvetően negatív szabályozó funkciót betöltő fehérje, mely a gyulladásos válasz során a MAPK-ok gátlásán keresztül csökkenti a proinflammatorikus citokinek mennyiségét.

Transzkripciós faktorok és citokinek

Az NF- κ B transzkripciós faktor számos gén aktivitásának szabályozásával vesz részt a fertőzés következtében fellépő gyulladásos válaszban. Az LPS molekula TLR-hoz való bekötődése különböző intracelluláris jelátviteli útvonalakat indít be, melyek végezetül NF- κ B és AP-1 aktiválódást okoznak. Ezen transzkripciós faktorok proinflammatorikus citokineket, kemokineket és adhéziós molekulákat (pl. TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, ICAM-1, E-szelektin, P-szelektin, VCAM-1 and HMGB-1) kódoló génekhez kötődve serkentik azok expresszióját.

A TNF- α és az IL-1 β , mint a szervezet immunválaszának korai mediátorai, részleges szerepet játszanak a szeptikus sokk alatt kialakuló szervi elégtelenségekben. Plazma koncentrációjuk percekkel a fertőzést követően megemelkedik, de 3-4 óra elteltével, a késői fázisban (súlyos szepszis) szintjük a detektálható határ alá süllyed. A TNF- α -nak jelentős jelerősítő funkciója is van, hiszen autokrin és parakrin módon aktiválva más makrofág és monocita sejteket, azok újabb proinflammatorikus citokin termelésével hozzájárul a gyulladásos folyamat fokozódásához. Ellentétben a fent említett citokinekkel, az IL-10 mennyisége a szepszis késői fázisában növekszik meg, vélhetően így módon hozzájárulva az immunválasz mérsékléséhez.

ROS termel és a gyulladásban

A gyulladós folyamatok mellett az oxidatív stressznek is fontos szerepe van a szepszis patomechanizmusában. Endotoxémiában a képződött reaktív oxigén és nitrogén származékok (ROS/RNS) a sejtkárosító folyamatok fontos mediátorai. Gyulladásban az iNOS expressziójának növekedése fokozott NO termeléshez vezet, mely stabil termékekké, nitritté és nitráttá alakul át. Reaktív oxigén származékok a sejtek normál anyagcseréje során is keletkeznek pl. a mitokondrium légzési lánc mentén, az arachidonsav metabolizmus alatt, vagy a xantin-oxidáz és NADPH-oxidáz reakciókban. A megnövekedett ROS és RNS membránlipid peroxidációt, fehérje oxidációt és DNS törést okoz, mely folyamatok a membrán fluiditás megváltozásához, sejtintegritás megsértéséhez, a sejtek energia szintjének csökkenéséhez és végső soron sejt és szövet roncsolódáshoz vezetnek. Ezenfelül az oxidatív károsodás számos kórkép patogenezisében jelentős szerepet játszik, úgymint neurodegeneratív (pl. Alzheimer kór) és kardiovaszkuláris megbetegedések, szepszis és szepsztikus sokk.

Védekezés mechanizmusai kifejlesztésével, az aerob szervezeteknek lehetőség nyílt a ROS termelés és az antioxidáns rendszer közti megfelelő egyensúly megteremtésére. Ez az antioxidáns rendszer számos olyan enzimet tartalmaz (úgymint szuperoxid-dizmutáz (SOD), kataláz (CAT), glutation-peroxidáz (GSHPx), és glutation-reduktáz (GSSGR)), amelyek a szuperoxid gyökök és a hidrogén-peroxid befogásával, illetve azok kevésbé reaktív molekulákká történő átalakításával fejtik ki védő hatásukat. A szervezetben ezeken kívül létezik egy nem-enzimatikus védelmi vonal is, melynek tagjai pl. a C- vagy E-vitamin, glutation és a karotinoidok. Ezekről az antioxidánsokról leírták, hogy amellett, hogy csökkentik a sejten belüli szabadgyökök termelését, *in vivo* és *in vitro* gátolják az NF- κ B transzkripciós faktor aktivitását. Ezen eredmények azt sugallják, hogy az antioxidánsoknak a reaktív gyökök eliminálásán kívül, jótékony hatásuk lehet különböző gyulladós folyamatokban, pl. szepszisben is.

Polifenolok

Számos, a mindennapi étrendünk részét képező növény vagy növényi származék (pl. gabonafélék, bogyós gyümölcsök, hüvelyesek, tea, sör, szőlő/bor, olíva olaj, csokoládé/kakaó, dió- és mogyorófélék, fűszerek) tartalmaz polifenolokat. Ezen vegyületeket, mint természetes antioxidánsokat, a növények a baktériumok és gombák elleni védekezés részeként termelik. Jelenleg is igen nagyszámú tradicionális medicinában alkalmazott, illetve egészséges ételekben előforduló vegyület (pl. rezveratrol, kurkumin, katechinek) gyulladásgátló hatását

vizsgálják klinikai alkalmazás céljából. Habár felszívódásuk, biológiai hasznosulásuk és metabolizmusuk nem teljesen ismert, úgy t nny, hogy bizonyos polifenolok natív vagy módosított formában történ felszívódásuk után, jelent s biológiai aktivitással rendelkeznek.

Igazoltnak látszik, hogy az egészséges ételek bioaktív komponensei (pl. kurkumin, rezveratrol, kapszaicin, katekinek, vitaminok, béta karotin, növényi rostok) képesek megfékezni a gyulladási folyamatokat, megváltoztatják a sejtek jelátviteli útvonalait, befolyásolják a sejtek osztódását, apoptózist és redox egyensúlyát, illetve sok esetben hatásosak lehetnek neurodegeneratív és kardiovaszkuláris megbetegedésekben vagy éppen a rák elleni küzdelemben. A polifenolok antiinflammatorikus hatásukat több szinten, a MAPK, Akt és NF- κ B útvonalak módosításával, gyulladási citokin és kemokin termelés gátlásával, és a COX és iNOS gének elnyomásán keresztül, a ROS és RNS produkció csökkentésével fejtik ki.

A polifenolok gyenge vízben való oldhatósága miatt számos kétely merült fel arra vonatkozóan, hogy alacsony biológiai hasznosulásuk miképp magyarázza a kiváló farmakológiai hatásukat. A legújabb tanulmányok, melyek szerint az egészséges ételekben el forduló polifenolokat a bélflóra baktériumai kismolekulájú, vízdoldékony, könnyebben hasznosuló fenolsavakká és fenolaldehidekké bontják le, meger sítik annak a valószínűségét, hogy inkább ezek a metabolitok felel s az eredeti polifenoloknak tulajdonított antiinflammatorikus hatásért. A ferulaldehid (FA) is egy, a polifenolok lebomlása során keletkező vegyület, melyet vörös bor és csokoládé elfogyasztása után nagy koncentrációban mutattak ki vizeletben. Oxidált alakjáról, a ferulsavról (4-hidroxi-3-metoxi fahéjsav) azt is leírták, hogy más antioxidánsokhoz (pl. C-vitamin) képest hosszabb ideig marad a véráramban, így a biológiai hasznosulása minden eddig vizsgált flavonoid vagy monofenolos vegyületénél magasabb fokú.

A ferulsav és a FA a sikimát útvonalon képz dik a növényi fenilalanin és tirozin metabolizmus termékeként. A ferulsav antioxidáns potenciálja molekuláris felépítésében rejlik; három jellegzetes szerkezeti egysége (a benzol gy r 3-metoxi és 4-hidroxi csoportjai, illetve a karboxil csoport) felel s a szabadgyökfogó tulajdonságáért. A ferulsav részben kiváló antioxidáns és gyulladásgátló sajátságainak köszönhetően terápiás hatásának bizonyult számos betegség, például rák, diabétesz, kardiovaszkuláris, gyulladási és neurodegeneratív kórképek kezelésében. A ferulsav és a FA szerkezeti sajátságaiban nagyban hasonlítanak egymáshoz, csupán egy funkcionális csoportban különböznek. A nagyfokú felépítésbeli egyezés, illetve a könnyen karboxil csoporttá oxidálódó reaktív aldehid csoport jelenléte miatt

feltételezhet, hogy a FA a ferulsavhoz hasonló, vagy talán még jobb biológiai aktivitással bírhat.

Célkit zések

1. A legújabb *in vitro* kísérleteken alapuló tanulmányok meger sítették annak a valószínűségét, hogy a tradicionális medicinában használt és egészséges ételeinkben el forduló polifenolok antiinflammatorikus hatásért nem annyira k maguk, mint inkább a bél baktériumflórája által, bel lük képz d kismolekulájú, vízdékony metabolitok felel sek. Ezen hipotézis *in vivo* bizonyítására els célkit zésünkben LPS-indukálta szeptikus sokk modellben, egérben, illetve LPS- és interferon- γ (IFN- γ)-aktivált primer hepatocitákon vizsgáltuk egy polifenol degradációs végtermék, a ferulaldehid hatását. További célunk volt olyan jelátviteli útvonalak, transzkripciós faktorok és gyulladásos citokinek azonosítása, melyeken keresztül a FA kifejtheti antiinflammatorikus hatását.

2. *In vivo* kísérleteink azt mutatták, hogy a vízdékony polifenol degradációs végtermék ferulaldehid, antiinflammatorikus hatását a gyulladás korai fázisában fejtette ki. Mivel a makrofágok azok a sejtek, melyek a szervezet els védelmi vonalaként reagálva a fert zésre, kiemelked en fontos szerepet játszanak a korai gyulladásos válasz kialakításában, ezért második célkit zésünk az volt, hogy megvizsgáljuk a ferulaldehid jelátviteli folyamatokra gyakorolt hatását LPS-indukálta RAW 264.7 makrofág sejteken.

3. Számos kísérlet igazolja, hogy LPS és oxidatív stressz hatására a MAPK-ok aktiválódnak. Defoszforilációjukért és deaktivációjukért részben az MKP-1 felel s, amely ily módon jelent s negatív szabályozó szerepet tölt be az LPS hatására bekövetkező természetes immunválaszban. Ezen tények alapján harmadik célkit zésünk az volt, hogy fényt derítsünk az MKP-1 korai gyulladásos folyamatokban betöltött szerepére RAW 264.7 makrofág sejtvonalon.

4. Végezetül, mivel az *in vivo* és *in vitro* kísérleti rendszereink számos tekintetben eltérnek egymástól, els sorban a MAPK-okra fókuszálva megvizsgáltuk és összehasonlítottuk a különböző modelljeink jelátviteli útvonalait.

Eredmények

A ferulaldehid csökkentette az egerek LPS-indukálta mortalitását

In vivo modelleinkben a FA-et 6 mg/testsúly kg dózisban, az LPS-t pedig két különböző koncentrációban alkalmaztuk; 20 mg/testsúly kg-ban (*szubletális, alacsonyabb*) az LPS molekuláris mechanizmusának vizsgálatára és 40 mg/testsúly kg-ban (*letális, magasabb*) a túlélési kísérletekben. Túlélési tesztünkben a magasabb LPS dózis használata (40 mg/testsúly kg, i.p., LPS csoport) 36-48 órán belül az állatok 80%-os elpusztulását eredményezte. Abban az esetben, amikor a C57BL/6 típusú egereket az LPS beadása előtt 1 órával ferulaldehiddel kezeltük, majd ezt minden 12. órában megismételtük (LPS+FA csoport), az állatok túlélési rátája megemelkedett azon csoporthoz képest, amelyben az állatok csak fiziológiás sóoldatot kaptak. 36-48 órával az LPS beinjektálása után az LPS+FA csoportban 70%-os túlélést tapasztaltunk, szemben az LPS csoport 20%-os túlélésével. Habár a ferulaldehid végül (100 órával az LPS kezelés után) nem tudta megakadályozni az egerek elhullását, mégis a túlélési idejük meghosszabbításával képes volt pozitívan befolyásolni az LPS-indukálta inflammatorikus választ és oxidatív stresszt. A ferulaldehid védő hatása tehát sokkal kifejezettebb volt az LPS-kiváltotta szeptikus sokk korai szakaszában, mint a későbbi súlyos szepszisben. A ferulaldehid kezelés önmagában nem okozott semmiféle károsodást vagy elváltozást az egerekben, mint ahogy túlélésüket sem befolyásolta.

A ferulaldehid *in vivo* gátolta az LPS-indukálta gyulladási választ

Az LPS-indukálta endotoxikus sokk *in vivo* detektálására MR képalkotó technikát alkalmaztunk. A kontrol, LPS és LPS+FA csoportokba tartozó egerek T2-súlyozott felvételeit az LPS beadását követő 6. órában készítettük. Ezek alapján megnövekedett jelintenzitást (gyulladás) tapasztaltunk az LPS-kezelt állatok hasüregének alsó régiójában, főleg a laterális szubkután részeken, a belek közötti területeken, illetve a vesék között. Ezzel szemben az LPS+FA csoport egereinek T2-súlyozott képei határozottan kisebb jelintenzitást mutattak, mely az inflammatorikus válasz szignifikáns csökkenésére utal. Az önmagában ferulaldehiddel kezelt állatok T2-súlyozott felvételei alapján véve nem különböztek a kontrol csoportétól.

A ferulaldehid csökkentette az LPS-indukálta TNF- α és IL-1 termelést, nem volt hatással az IL-6 mennyiségi változására, viszont fokozta az IL-10 termelést az egerek szérumban

Számos publikációban találunk utalást a TNF- α , IL-1 és IL-10 citokinek közötti összefüggésre, míg az IL-6 gyulladásos válaszban betöltött szerepével kapcsolatban ellentmondásosak az információk. LPS-indukálta endotoxikus sokk modellünkben még az alacsonyabb (20 mg/testsúly kg) LPS koncentráció alkalmazása is – mely a túlélési tesztben az egerek kismértékű elhullását okozta – jelentős proinflammatorikus citokin termelést eredményezett. Ezek mennyiségét a kontrol, LPS-, LPS+FA- és FA-kezelt egerek szérumból, 1,5 és 3 órával az LPS beadása után mértük enzim-kapcsolt immunosorbent assay (ELISA) segítségével. Eredményeink, melyek szerint a FA nem befolyásolta az LPS-indukálta IL-6 szint emelkedését azt sugallják, hogy az alkalmazott egér septicus sokk modellünkben a FA nem az IL-6 koncentrációjának módosításán keresztül fejtette ki antiinflammatorikus hatását. Mindemellett azt tapasztaltuk, hogy a FA nemcsak a proinflammatorikus TNF- α és IL-1 szintjeit csökkentve, hanem az antiinflammatorikus IL-10 mennyiségét is emelve, jelentősen csillapította az LPS hatására bekövetkező *in vivo* gyulladásos választ.

A ferulaldehid gátolta az LPS+IFN- γ -indukálta NO $_2^-$ és ROS termelést primer hepatocitákban

A reaktív oxigén és nitrogén gyökök eliminálása vagy keletkezésük gátlása mérsékli a szervezetben a gyulladás okozta károsodásokat. Mivel korábbi vizsgálatainkban, részben a hepatociták ROS és NO termelésének köszönhetően, az LPS-kezelt egerek májában jelentős patológiai elváltozásokat figyeltünk meg, további kísérleteinket primer hepatocitákon folytattuk. A FA LPS+IFN- γ -indukálta NO $_2^-$ és ROS termelésre kifejtett hatását 24 órás inkubáció után, a sejtek médiumából mértük Griess reagens, illetve egy fluoreszcens redox festék használatával. A májsejtek maximális aktivációja érdekében az 5mg/L LPS kezelést 50 μ g/L IFN- γ -nal kombináltuk. A 24 órás inkubációs periódus alatt, az LPS+IFN- γ kezelés hatására bekövetkező megemelkedett ROS és NO $_2^-$ termelést a FA 50 μ mol/L koncentrációban alkalmazva teljesen megszüntette. A FA a legmagasabb koncentrációban (100 μ mol/L) a ROS mennyiségét kontrol szint alá, a NO $_2^-$ mennyiségét pedig a kontrol szintjére csökkentette.

A ferulaldehid gátolta az LPS-indukálta NO₂⁻ és ROS termelést RAW 264.7 makrofágokban

A makrofágok, a szervezet immunrendszerének első védelmi vonalaként, proinflammatorikus citokin-, reaktív oxigén- és nitrogéngyök termelésükkel, kiemelkedően fontos szerepet játszanak a patogének eliminálásában. Ezek alapján Griess reagens, illetve egy fluoreszcens redox festék használatával meghatároztuk a FA LPS-indukálta NO és ROS termelésre kifejtett hatását RAW makrofág sejtekben. A ROS és NO képződést 24 órás 100ng/ml LPS kezeléssel idéztük elő, mely ezen kísérletes felállásban nem bizonyult citotoxikusnak. Hasonlóan a primer hepatocita modellben kapott eredményekhez, a FA koncentráció-függően csökkentette az LPS hatására megnövekedett reaktív oxigén és nitrogén gyökök mennyiségét. Mivel az 50 µM-os FA az LPS-indukálta ROS mennyiségét kontrol szint alá, a nitrit mennyiségét pedig a kontrol szintjére csökkentette és ez koncentrációhozát teljesen megfelelt az *in vivo* kísérletekben alkalmazott 6 mg/testsúly kg-nak, ezt az 50 µM-os FA koncentrációt használtuk a további *in vitro* modelleinkben.

A ferulaldehid megvédte a mitokondriális membrán potenciált RAW 264.7 makrofágokban

A szabadgyökök képződésének egyik fő forrása a mitokondriális légzési lánc. A megemelkedett intracelluláris ROS szint a mitokondriális membránpotenciál (Δψ_m) összeomlásához vezet, ami újabb ROS produkciót eredményez. Kísérleteinkben a Δψ_m változását egy sejt-permeábilis, feszültség-érzékeny, fluoreszcens mitokondriális festék, a JC-1 segítségével vizsgáltuk. A JC-1 festék 488 nm-es fényrel gerjesztve, mitokondriális membrán depolarizáció esetében zöld, normál mitokondriális membránpotenciál mellett pedig piros fényt emittál. Áramlási citometriai analízist alkalmazva azt találtuk, hogy a 100 ng/ml LPS kezelés, minden vizsgált (5, 10, 30, 60 perc) időpontban mitokondriális membrán depolarizációt okozott, amelyet a FA sikeresen megszüntetett. A makrofág sejteket ezután fluoreszcens mikroszkóppal tovább vizsgáltuk és 30 perces 100 ng/ml LPS hozzáadása után, a mitokondriális membrán depolarizáció jeleként zöld fluoreszcenciát tapasztaltunk. A FA 50 µM-os koncentrációban fenntartotta az eredeti Δψ_m-t, amelyre a mitokondriumban megjelenő J aggregátumok piros fluoreszcenciája utalt. A FA LPS-indukálta mitokondriális membrán depolarizációra gyakorolt védő szerepe is rámutat a mitokondriumok integritásának fontosságára a korai gyulladási válaszban.

A ferulaldehid negatívan szabályozta az LPS-indukálta JNK és Akt foszforilációt, valamint az NF- κ B aktivációt májban

Az LPS CD14/TLR4/MD2 komplexhez való kötődése különböző jelátviteli útvonalakon keresztül (pl. MAPK, Akt, AP-1 és NF- κ B aktiválás) szisztémás szövetkárosodáshoz vezet. Ezen tények alapján először LPS-kezelt egerek májában vizsgáltuk a FA MAPK, Akt és NF- κ B útvonalakra kifejtett hatását. Kísérleteinkben 1,5 órával az LPS beadása után, Western-blot technikával mértük a JNK, ERK1/2, p38 MAPK-ok és az Akt foszforilációját a kontrol, LPS-, LPS + FA- és FA-kezelt egerek májából. LPS hatására a p38 MAPK kivételével az összes kináz foszforilációja, azaz aktivációja megnövekedett, melyet a FA a JNK és az Akt esetében szignifikánsan mérsékelni tudott. Kísérleti modellünkben a FA önmagában nem befolyásolta egyik kináz foszforilációját sem.

Az NF- κ B aktivációját és nukleáris transzlokációját 1,5 órával az LPS beadása után, transzkripció faktor assay segítségével mértük kontrol, LPS-, LPS + FA- és FA-kezelt egerek májából. A kontrol májhoz viszonyítva, az LPS-kezelt állatok májában közel négyszeres NF- κ B aktivációt tapasztaltunk, míg az LPS + FA-kezelt egerek májában az NF κ B aktivációjának és nukleáris transzlokációjának jelentős mértékű csökkenését figyeltük meg. Kísérleti modellünkben a FA önmagában nem befolyásolta az NF κ B aktivációját.

A ferulaldehid megszüntette az LPS-indukálta MAPK-ok foszforilációját RAW 264.7 makrofágokban

Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy a MAPK-ok milyen szerepet játszanak a FA védő hatásában RAW makrofágokban, a p38, ERK1/2 és JNK foszforilációját foszfospecifikus elsődleges antitestekkel Western-blottal határoztuk meg a kontrol, LPS-, LPS + FA- és FA-kezelt sejtek médiumából, 10 és 30 perces LPS-kezelést követően. LPS hatására az összes kináz foszforilációja, azaz aktivációja, a 10 perces JNK kivételével, mindkét vizsgált időpontban megnövekedett, amit a FA csökkenteni tudott. A FA önmagában nem befolyásolta a MAPK-ok foszforilációját.

A ferulaldehid az MKP-1 expressziójának fokozásán keresztül szabályozta az LPS-indukálta MAPK aktivációt

Az MKP-1-ről leírták, hogy képes a MAPK-ok defoszforilációjára, továbbá jelentős negatív szabályozó szerepet tölt be az LPS által kiváltott veleszületett immunválaszban. Emellett intraperitoneális makrofágokban 60 perces LPS kezelést követően, egyidejűleg a

MAPK-ok foszforilációjának csökkenésével, MKP-1 aktivációt mutattak ki. Munkacsoportunk viszont, az MKP-1 gyors felezési idejének ismeretében, a korai (10 és 30 perces) LPS és FA kezelés MKP-1 expressziójára gyakorolt hatását vizsgálta. Ellentétben a korábbi megfigyelésekkel, melyek szerint az LPS folyamatosan képes fokozni az MKP-1 expresszióját, Q-RT-PCR eredményeink azt mutatták, hogy 10 perces 100ng/ml LPS kezelést követően az MKP-1 mRNS szintje a kontrol érték felére süllyedt, majd 30 perces LPS kezelés után megnövekedve, újra elérte azt. A FA a 10 perces LPS hatására bekövetkező MKP-1 mRNS szint csökkenést megakadályozta, és emellett önmagában, illetve 30 perces LPS kezeléssel kombináltan alkalmazva, az MKP-1 mRNS expresszióját jelentősen megemelte. Az MKP-1 mRNS expressziója mellett Western-blottal vizsgáltuk a fehérje mennyiségét is, amely késleltetve korrelált a mRNS szintváltozásokkal. Nevezetesen, 30 perces 100ng/ml LPS kezelést követően az MKP-1 fehérje koncentrációja csökkent (mely FA adásával megelőzhető volt), majd 60 perc után megemelkedett. Eredményeinket összegezve elmondhatjuk, hogy a MAPK-ok aktivációját követő MKP-1 expresszió növekedésnek talán kompenzáló szabályozó szerepe lehet. A FA-ról pedig elmondható, hogy azzal, hogy elérte és segítette ezt az emelkedését, jelentős szerepe van a MAPK-ok aktivációjának csökkentésében.

A ferulaldehid gátolta az LPS-indukálta NF- κ B aktivációt RAW 264.7 makrofágokban

A megemelkedett ROS produkció és MAPK aktiváció végső soron az NF- κ B magba történő transzlokációjához vezet. Kísérleteinkben vizsgáltuk, hogy RAW 264.7 makrofágokban az LPS és a FA MAPK-okra gyakorolt hatása korrelál-e az NF- κ B aktivációjával. Az NF- κ B aktivációját egyrészt 10 perces 100 ng/ml LPS kezelést követően a p65 alegységének foszforilációjával, Western-blottal, másrészt 24 órás 5 és 50 ng/ml LPS adása után az NF- κ B-függő luciferáz akkumulációjával, NF- κ B-luciferáz riporter plazmiddal határoztuk meg. Eredményeink azt mutatják, hogy még az 5 ng/ml LPS is egy drasztikus NF- κ B aktivációt okozott, amelyet 50 μ M FA csökkenteni volt képes. A FA önmagában nem befolyásolta az NF- κ B aktivációját.

A ferulaldehid direkt szabadgyökfogó aktivitása

Miután kísérleteinkben azt találtuk, hogy a FA mind LPS és IFN- γ -kezelt primer hepatocitákban, mind RAW makrofágokban csökkentette az NO₂⁻ és a ROS termelést, megvizsgáltuk, hogy antioxidáns tulajdonsága ezen szabadgyökfogó aktivitásának köszönhető-e. A ferulaldehid direkt szabadgyökfogó aktivitását egy fluoreszcens redox festék,

a dihidrorodamin 123, H₂O₂-indukálta oxidációjával teszteltük egy sejtmentes *in vitro* rendszerben. A ferulaldehid, 5-100 µmol/L koncentrációban alkalmazva, koncentráció-függő módon csökkentette a festék oxidációját és szabadgyökfogó aktivitása az ismert antioxidáns resveratroléval volt közel azonos. A resveratrol irodalomból ismert citokin profilra, NF- B transzlokációra és kináz jelátvitelre kifejtett hatásai nagyon hasonlóknak bizonyultak a ferulaldehid hatásaihoz, továbbá kísérleteinkben kimutattuk, hogy a FA természetes komponensként vagy lebomlási végtermékként, a resveratrollal összemérhető koncentrációban található meg a vörösborban.

Konklúzió

1. *In vivo* kísérleteinkben azt találtuk, hogy a ferulaldehid, mely számos polifenol vegyület mikrobiális végterméke, antiinflammatorikus hatását egyrészt az LPS-kezelt egerek szérumában mért korai proinflammatorikus citokinek (TNF- , IL-1β) szintjének csökkentésével, másrészt az antiinflammatorikus IL-10 mennyiségének fokozásával fejtette ki. Ezenfelül, a FA gátolta az LPS-indukálta NF- B transzkripciós faktor aktivitását az egerek májában. Adataink alapján feltételezhetjük, hogy ezen hatások az LPS-indukálta JNK és Akt aktiváció csökkentésének köszönhetők. Továbbá a FA mérsékelte a ROS és RNS képzést LPS és IFN- γ-kezelt egér primer hepatocitákban, mely hatások várhatóan szintén hozzájárulnak a FA gyulladáscsökkentő tulajdonságához. Ezen eredményeink szolgáltatják az első *in vivo* bizonyítékot arra, hogy a polifenolok egy vízoldékony lebomlási terméke felelősek, vagy legalábbis szignifikánsan hozzájárul a polifenol tartalmú egészséges ételek, természetes termékek és tradicionális gyógyszerek gyulladáscsökkentő hatásához.

2. Makrofág modellünkben azt találtuk, hogy a ferulaldehid csökkentette a ROS és RNS képzést és megvédte a mitokondriumokat az LPS-indukálta gyors és nagymértékű membrán depolarizációtól, amely jelzi a mitokondriumok integritásának fontosságát az korai gyulladási válaszban. Ezenkívül, a FA, az NF- B gátlásán keresztül csökkentette a JNK, ERK és p38 MAPK-ok aktivációját LPS-kezelt RAW 264.7 sejtekben.

3. *In vitro* modellünkben, ellentétben a korábbi megfigyelésekkel, melyek szerint az LPS folyamatosan képes fokozni az MKP-1 expresszióját, azt találtuk, hogy az LPS az MKP-

1 szintjének korai csökkenését indukálta, amely együtt járt a MAPK-ok aktivációjával. Továbbá kimutattuk, hogy a FA azáltal, hogy el rehozta az MKP-1 mRNS expressziójának és fehérje mennyiségének a növekedését, jelentős szerepet játszik a MAPK-ok aktivációjának csökkentésében makrofág sejtekben. Ezen adatok egyértelműen jelzik az MKP-1 expresszió szabályozásának fontosságát, illetve felvetik ezen molekula potenciális terápiás target szerepét a korai gyulladási folyamatokban.

4. Az ugyanazon LPS molekula hatására beinduló jelátviteli mechanizmusok az egerek májában és a makrofág sejtekben eltérő kináz aktivációs mintázatot mutattak. Kimutattuk, hogy az egerek májában a FA gátolta az LPS-indukálta JNK aktivációt, de nem volt hatással az ERK1/2 és p38 MAPK útvonalakra. Ellentétben az *in vivo* modellünkkel, makrofág sejtekben a FA, a 10 perces ERK1/2 kivételével mindhárom MAPK LPS-indukálta aktivációját csökkentette, ami felveti a makrofágokban az LPS hatására bekövetkező MAPK aktiváció egységes szabályozásának lehetőségét. Ezen eltérő eredmények az alkalmazott gyulladási modellek különbözőségéből, illetve az LPS-indukálta folyamatok sejt- és szövet-specifitásából adódhatnak. A makrofágok, a szervezet patogénekkal szembeni első védelmi vonalaként, intenzívebb behatásoknak vannak kitéve, így egy erősebb védekezési választ generálnak a kórokozók eliminálására. Ezzel ellentétben a máj, amely az *in vivo* kísérleteink célszerve volt, a különböző bakteriális fertőzéseknek target szerveként a patogénekre egy más típusú védekezési válasszal reagál.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Sümegi Balázs és Dr. Gallyas Ferenc Professzor uraknak, a tőlük kapott támogatásért és útmutatásért.

Köszönöm közvetlen kollégáimnak, dr. Radnai Balázsnak és dr. Veres Balázsnak az együttműködésüket, támogatásukat és tanácsaikat.

Technikai segítségükért szeretnék köszönetet mondani Halász Helenának, Pásztor Istvánnak, Girán Lászlónak és Horváth Bertalannak.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani Dr. Hideg Kálmán Professzor úrnak a ferulaldehid szintetizálásáért és számunkra bocsátásáért.