

**Különböz mechanizmusok az  
NF- $\kappa$ B és kináz kaszkád  
rendszerek szabályozásában a  
gyulladásban**

*PhD tézis*

**Radnai Balázs**



**PhD programvezet : Prof. Sümege Balázs DSc**

**Pécsi Tudományegyetem,  
Általános Orvostudományi kar,  
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet**

**2010.**

# Rövidítések

## Általános rövidítések

**3-AB**, 3-aminobenzamid; **API**, aktivátor protein 1; **COX**, ciklooxygenáz; **ERK1/2**, extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2; **FA**, ferulaldehid; **FCA**, ferulsav; **HMG**, nagy mobilitású csoport; **4HQN**, 4-hidroxikinazolin; **IFN**, interferon; **IL**, interleukin; **iNOS**, indukálható NO szintáz; **JNK**, c-Jun N-terminális kináz; **LPS**, lipopoliszacharid; **MAPK**, mitogén aktivált protein kináz; **MD-2**, myeloid differenciációs protein-2; **MAL**, MyD88 adapter szer protein; **MKK**, MAPK kináz; **MIP-2**, makrofág gyulladáscsökkentő protein-2; **MyD88**, myeloiddifferenciáló 88 faktor; **MRI**, mágneses magrezonanciás képalkotás; **NF- $\kappa$ B**, nukleáris faktor-kappa B; **PAMP**, patogén asszociált molekuláris mintázat; **PARP**, poli-(ADP-ribóz) polimeráz; **PI3**, foszfatidilinozitol 3; **p90RSK**, p90 riboszómális S6 kináz; **PRR**, patogén felismerő receptor; **PSS**, fiziológiás só oldat; **RNS**, reaktív nitrogén származékok; **ROS**, reaktív oxigén származékok; **TLR**, toll szer receptor; **TNF $\alpha$** , tumor nekrozis faktor; **TRAF-6**, TNF-receptor asszociált faktor 6.

## Kezelési csoportok rövidítései

**CTRL**, fiziológiás sóoldattal kezelt; **4HQN**, 4HQN-nal kezelt; **FA**, FA-del kezelt; **LPS**, LPS-sel kezelt; **LPS + 4HQN**, LPS-sel és 4HQN-nal kezelt; **LPS + FA**, LPS-sel és FA-del kezelt.

# Bevezetés

## Szepszis:

A szepszis szó a „rothadás” avagy „rothadást el idéző” kifejezések görög megfelelőjéből „*sapios*” származik. A szepszis az immunrendszer szisztémás válasza a szövetekbe betörő mikroorganizmusok ellen, egy olyan tünetegyüttes, mely fertőzéses következménye és bizonyos célszervek károsodását idézi el messze az infekció kiindulópontjától. A hosszú évtizedekre visszanyúló intenzív kutatás ellenére a szepszis ma is az egyik leggyakoribb halálok 750,000 esetszámmal egy évben, csak az USA intenzív betegellátásában, melyben 1215,000 halállal végződik. A szepszis a harmadik vezető halálozási ok a fejlett társadalmakban, mely el fordulása az akut miokardiális infarktussal említhető.

együtt. S bár rengeteg hatásos antibiotikum áll rendelkezésünkre a terápiához, a szepszis továbbra is vélhetően a vezető halálozási okok egyike marad, mert bár ezek a vegyületek képesek a fertőző baktériumok eliminálására, ugyanakkor képtelenek a szisztémás gyulladási folyamatok kontrollálására.

### **LPS jelátvitel:**

A veszélytett immunrendszer a védelem első vonala a fertőző ágensekkel szemben. Egyik legfontosabb feladata, hogy felismerje az adott patogénhez köthető molekuláris mintázatot (PAMP), pl.: a lipopoliszacharid (LPS) molekulát, mely a Gram-negatív baktériumok külső sejt falában fordul elő. A bakteriális patogén ellen indított immunválasz vizsgálatára kiváló modellnek bizonyult az LPS-indukált makrofág modell. Az LPS a CD14/TLR4/MD2 sejt felszíni receptor-komplexhez való kötődésével viszi a gyulladási jelet a makrofág sejtbe, mely különböző adapter proteinek aktiválásán keresztül, számtalan jelátviteli útvonalat indít be. A toll-szerű receptor 4 (TLR4)-hez kötődő legfontosabb adapter molekulák a myeloid differenciáló 88 faktor (MyD88) és az MyD88 adapter szerű protein (MAL), amelyek aktiválják többek között a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) útvonalakat és a foszfatidilinozitol 3 kináz/Akt (PI3K/Akt) útvonalat, elbájt a TNF-receptor asszociált faktor 6-on keresztül (TRAF6). Az aktiválódott jelátviteli útvonalak, mint a MAPK útvonalak - extracelluláris szignál-regulált kináz (p42/44 MAPK vagy ERK1/2), p38 és c-Jun N-terminális kináz (JNK) útvonalak - illetve a MAPK-tól független PI3K/Akt útvonal több más kináz foszforilálásával és néhány fontos transzkripciós faktor, mint a nukleáris faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B) aktiválásával indukálja a sejtben a gyulladási választ.

### **Transzkripciós faktorok, az NF- $\kappa$ B:**

MAPK és az Akt útvonalak nukleáris transzkripciós faktorok aktivitását (aktivátor protein 1 (AP-1)) illetve citoplazmatikus transzkripciós faktorok (NF- $\kappa$ B) aktivációját és nukleáris transzportját eredményezik, melyek számos gyulladási gén expressziójához vezetnek.

Az NF- $\kappa$ B, mint egy fontos gyulladási transzkripciós faktor, felelős több citokin, kemokin, növekedési faktor, sejt adhéziós molekula és néhány akut fázis protein expressziójáért, melyek fontos szerepet játszanak az LPS-indukált gyulladási folyamatok mediálásában. Az NF- $\kappa$ B általánosan előfordul szinte minden állati sejt típusban. Aktivitását olyan stimulusok eredményezik, mint a stressz, citokinek, szabadgyökök, ultraibolya sugárzás, oxidált LDL és bakteriális vagy virális antigének. Az aktuális szerepét illetően az

NF- B-t kapcsolatba hozzák a rákkal, gyulladással és autoimmun megbetegedésekkel, virális fertőzésekkel és az immunrendszer elégtelen fejlődésével. Az NF- B aktivitás olyan gének gyors expresszióját indukálja, melyek permanensen aktívak több gyulladással megbetegedésben, mint a bélgyulladás, ízületi gyulladás, asztma, szepszis és szepszisszerű sokk, és pathomechanizmusukban az oxidatív stressznek kitüntetett szerepe van. Így több olyan növényi eredetű, a népi gyógyászatban is használt vegyületrel feltételezhető, melynek antioxidáns, antiinflammatorikus és rákellenes hatását korábban bizonyították, hogy hatásosan gátolják az NF- B transzkripciós faktort. Úgy tűnik tehát, hogy kapcsolat van a gyulladás és a rák kialakulása között és az egyik lehetséges kapcsoló maga az NF- B. Ez a felismerés drámaian felértékeli azon növényi vegyületek (pl.: polifenolok) jelentőségét, melyek az NF- B aktivitását befolyásolni képesek.

### **Gyulladással citokinek és az oxidatív stressz:**

Az NF- B tehát kitüntetett szerepet játszik a Gram-negatív baktériumok indukálta gyulladással folyamatok mediálásában. Úgy az endotél és epitél sejtek, mint a neutrofilek, makrofágok és limfociták hatalmas mennyiségű inflammatorikus mediátor felszabadításával válaszolnak a transzkripciós faktorok aktivitására. Ezek legfontosabb képviselői a tumor nekrozis faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin (IL)-6, IL-1 és IL-8, E-szelektin, intercelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1, avagy CD54), vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1 (VCAM-1, avagy CD106), szöveti faktor (TF) és a nagy mobilitású csoport-1 (HMGB-1), több más molekula mellett, melyek a gyulladást indukálják. Ezek a citokinek a szervezet szempontjából olyan hasznos gyulladással választ indukálnak, mint például a lokális koaguláció, ami korlátozza a szöveti károsodást. De ezen proinflammatorikus citokinek túlzott termelése még veszélyesebb lehet, mint az eredeti stimulus, mivel felülírhatja az immunrendszer normál szabályozását és gyulladással megbetegedésekhez vezethet.

Az inflammatorikus citokinek felszabadulása mellett az oxidatív stressz is része a szepszisszerű sokk pathomechanizmusának. A szepszissben több ismert szabadgyök termelő enzim expressziója megnövekszik, mint a ciklooxygenáz-2 (COX-2) ami szuperoxidot ( $O_2^{\cdot-}$ ) termel, mely egy reaktív oxigén származék (ROS), vagy az indukálható NO szintáz (iNOS), ami nitrogén-monoxidot termel ( $NO^{\cdot}$ ), mely egy reaktív nitrogén származék (RNS). Az oxidatív stressz kitüntetett szerepet játszik több különböző megbetegedés pathogenezisében, mint a neurodegeneratív Alzheimer-kór vagy a szepszis, szepszisszerű sokk. Ezekben a betegségekben az oxigén és nitrogén tartalmú gyökök magas koncentrációja a sejt metabolizmusának felborulásához vezethet, azáltal, hogy fontos fehérjéket, lipideket, DNS és RNS molekulákat

károsítja. Emellett a reaktív oxigén és nitrogén gyökök (RONS) aktiválják a már jól ismert gyulladási transzkripciós faktort az NF- $\kappa$ B-t, amely kiemelkedő szerepet játszik a szeptikus sokk kifejlődésében is.

Így már nem meglepő, hogy több antioxidáns tulajdonságú vegyülettel is kimutatták, hogy gátolja az NF- $\kappa$ B-t és az általa aktivált gyulladási gének expresszióját, mint az iNOS, TNF, IL-1 és COX-2 az LPS indukálta makrofágokban, vélhetően a szuperoxid- és peroxid-gyökök eliminálása által. Továbbá a reaktív oxigén és nitrogén gyökök DNS töréseket okozhatnak az érintett sejtekben, ami a nukleáris poli-(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim aktivációjához vezet. Ezen enzim aktivációja pedig jelentősen hozzájárul a szepszis szövetkárosító hatásához. Így mind az antioxidáns tulajdonságú növényi vegyületek mind a PARP inhibitorok hatásosan gátolhatják – legalábbis részben – a patogén indukálta gyulladási folyamatokat.

### **A PARP enzim farmakológiai gátlása:**

Az első tanulmányok megjelenése után, melyek a PARP-1 szerepét vizsgálták számos különböző megbetegedésben, megnövekedett az igény PARP-1 inhibitorok fejlesztésére és klinikai kipróbálására. Egy már jól ismert PARP-inhibitorral a 3-aminobenzamid (3-AB) végzett kísérletek azt mutatták, hogy a PARP aktivitásnak legfeljebb marginális szerepe lehet a szeptikus sokk kialakulásában. De a vegyülettel kiderült, hogy gyenge PARP-1 inhibitor és toxikusnak bizonyult *in vivo*. Ezzel szemben néhány új és hatásos PARP-1 inhibitor védelmet nyújtott az LPS-indukálta szövetkárosodás ellen.

### **Polifenolok, ferulsav és ferulaldehid**

Számtalan, a tradicionális medicinában alkalmazott illetve egészséges ételekben előforduló vegyület, mint a rezveratrol, kurkumin vagy a proantocianidinek, antiinflammatorikus hatása miatt laboratóriumi és klinikai vizsgálatok tárgyát képezik. Mivel a vegyületek oldhatósága általában nem jó, így a kiváló farmakológiai hatás kifejtésének korlátozza a szer alacsony biológiai hozzáférhetősége „bioavailability” lehet. Emellett több új tanulmány bizonyítja, hogy az egészséges ételekben és italokban (gyümölcs, zöldség, csokoládé vagy vörösbor) előforduló nagy molekulájú polifenolokat a bélflóra metabolizálja kisebb molekulájú fenolsavakká és fenolaldehidekké. Evvel erősítve a hipotézist, miszerint inkább, de legalábbis részben a polifenolok mikrobiális degradációs termékei felelősek az eredeti polifenolnak tulajdonított antiinflammatorikus hatásért. A ferulsav (FCA) és a ferulaldehid (FA) feltételezhetően ilyen bomlástermék számtalan, az ételeinkben előforduló

polifenolnak, miután magas koncentrációban mutatták ki a vizeletben vörösbor és csokoládé elfogyasztása után. Az FCA-ról pedig az irodalomból tudjuk, hogy hosszabb idő után is kimutatható a vérben, mint más antioxidánsok (pl.: C-vitamin) és a biológiai hozzáférhetősége is magasabb, mint bármely eddig vizsgált táplálékainkban előforduló flavonoidnak vagy monofenolos vegyületnek.

Az FCA és az FA a sikimát útvonalon keresztül képződik a növényi fenilalanin és tirozin metabolizmusban. A ferulsav (4-hidroxi-3-metoxi fahéjsav) a fahéjsavak csoportjába tartozik és hasonlóan a többi fahéjsavhoz kiváló antioxidáns. Ez az antioxidáns potenciál a molekula 3 szerkezeti egységének tulajdonítható. A metoxi és hidroxil csoport, mint elektron donáló csoport megtöri a gyökös láncreakciót, a C-C kötés pedig befogja a szabad gyököket.

Az FCA részben kiváló antioxidáns tulajdonságának köszönhetően terápiás hatásának bizonyult különböző megbetegedésekben, mint a rák, diabétesz, kardiovaszkuláris és neurodegeneratív rendellenességek. Emellett a szakirodalom beszámol a ferulsav és észterének gyulladáscsökkentő hatásáról, mely szerint csökkentik néhány gyulladási mediátor expresszióját és biológiai hatását, mint a prosztaglandin E<sub>2</sub>, TNF $\alpha$  és az iNOS, LPS-stimulált sejtekben. Az FCA néhány hidrofób észterével kiderült, hogy hatásosabban gátolják az iNOS fehérje expressziót LPS+IFN $\gamma$  aktivált RAW264.7 makrofág sejtekben, mint az eredeti vegyület. Bebizonyosodott, hogy a feruloil-mioinozitolok, szignifikánsan gátolják a ciklooxygenáz-2 promotor aktivitást a DLD-1, humán vastagbélrák sejtvonalon. Továbbá ismert tény, hogy az FCA dóziszfüggően gátolja a MIP-2 fehérje expresszióját, LPS-stimulált RAW264,7 sejtekben.

Az FCA redukált formája a FA rendelkezik a ferulsav összes szerkezeti jellemzőjével egészen az aldehid csoportig. A nagyfokú hasonlóság miatt feltételezhető, hogy a FA hasonló vagy talán még jobb biológiai hatással bírhat, mint az FCA a reaktív aldehid csoportja miatt, mely könnyen oxidálódhat karboxil csoporttá. A szakirodalom igen gazdag a ferulsav különböző kísérleti modellekben bemutatott pozitív hatásáról szóló tanulmányokban, de a ferulaldehid vonatkozásában meglehetősen szegényes. Néhány a FA-ról publikált cikkben kiderül, hogy gátolja az LPS-indukált iNOS expressziót és NO-szintézist RAW264,7 egér makrofág sejtekben, illetve kiváló antioxidáns hatással bír, amely nagyjából a ferulsavéval egyezik meg.

# Célkit zés

**1.** Bár korábbi munkánkban bizonyítottuk a PARP gátlás antiinflammatorikus hatását LPS-indukálta szeptikus sokk modellben és bemutattuk a PI3K/Akt útvonal szerepét a PARP inhibitor gyulladásgátló hatásának kifejtésében, a pontos jelátviteli mechanizmus továbbra is ismeretlen. Jelen munkánkban els dleges célunk volt további LPS-indukálta jelátviteli útvonalak azonosítása, mint a MAPK útvonalak, melyek potenciálisan résztvehetnek a PARP-gátlás antiinflammatorikus hatásának kifejtésében.

**2.** *In vitro* kísérletek alapján felmerült annak a lehet sége, hogy az egészséges ételekben, italokban illetve a népi gyógymódokban alkalmazott készítményekben el forduló jól ismert és sokat vizsgált polifenolok hatásához dönt en hozzájárulhatnak azok mikrobiális degradációs termékei is. Hogy *in vivo* bizonyítsuk ezt a hipotézist következ célkit zésünk volt, hogy igazoljuk a FA, egy antioxidáns tulajdonságú vegyület hatását - mely mikrobiális degradációs terméke számos polifenolnak - LPS-indukálta szeptikus sokk modellben, egérben illetve egy LPS+IFN -indukálta primér hepatocita modellben. További célunk volt jelátviteli útvonalak, transzkripciós faktorok és gyulladáshoz köztörzsek azonosítása, melyek szerepet játszhatnak a FA antiinflammatorikus hatásának kifejtésében.

**3.** A PARP aktiváció és az oxidatív stressz külön-külön is felel s lehet a gyulladás kialakulásában fontos szerepet játszó NF- B transzkripciós faktor aktiválásáért és nukleáris transzportjáért. Így összehasonlítottuk a 4HQN (*potens PARP inhibitor elhanyagolható antioxidáns képességgel*) hatását a FA-dével (*potens antioxidáns, amelynek nincs direkt hatása a PARP-ra*) LPS-indukálta gyulladáshoz köztörzsek folyamatokban. Kísérleteinkben az NF- B aktivációhoz vezet jelátviteli folyamatokra fókuszáltunk.

**4.** Számos kísérletes munka bizonyítja azt az általunk is tapasztalt jelenséget, hogy az állatkísérletekben alkalmazott különböző egértörzsek eltér érzékenységgel reagálnak az olyan gyulladáshoz köztörzsekre, mint az LPS. A jelenség molekuláris háttere azonban még nem tisztázott. Utolsó célkit zésünk tehát az volt, hogy adataink összehasonlításával találjunk olyan jelátviteli mechanizmusokat, amelyek legalábbis részben okai lehetnek a mi modellünkben alkalmazott két különböző egértörzs LPS-sel szembeni eltér érzékenységének.

# Anyagok és eljárások

## Állatok

BALB/c és C57BL/6 egereket a Charles River Hungary Breeding LTD-d l vásároltuk. Az állatokat standard körülmények között tartottuk, csap vizet és egértápot (CRLT/N, Szindbad Kft, Hungary) biztosítottunk *ad libitum* a kísérlet teljes id tartama alatt. Az állatokat a laborállatok kezelésére vonatkozó szabályok szerint kezeltük az US NIH ajánlása alapján.

## Anyagok

Az LPS-t (*Escherichia coli* 0127:B8) és a 4-HQN-t a Sigma/Aldrich Corporation-t l vásároltuk (Saint Louis, MO or Budapest, Hungary). Az els antitesteket, azaz anti-foszfo-p44/42 MAP kináz (Thr202/Tyr204), anti-foszfo-Akt (Ser473, Thr308), anti-foszfo-GSK-3 (Ser9), anti-foszfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), anti-foszfo-p90RSK (Thr359/Ser363) a Cell Signalling Technology-t l vettük (Waltham, MA). Míg az anti-foszfo-p38-MAPK (Thr180/Tyr182) a Sigma, anti-COX-2 a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) az anti-HMG-1 a Becton Dickinson (San Diego, CA) termékei voltak. A ferulaldehid Prof. Hideg Kálmán kedves ajándéka volt (PTE, ÁOK, Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet).

## Sejtkultúra

Primér hepatocitákat C57BL/6 egerekb l izoláltunk (21-24 g) másút leírtak szerint (*Le Cam, 1993<sup>1</sup>*), apróbb módosításokkal. Azaz májat perfundáltunk *in situ* 50 mL fiziológiás sóoldattal (PSS), amely 6000 U/L heparint és 0.66 mmol/L EGTA-t tartalmazott. Ezt 50 mL PSS követte, majd 35 mL PSS 0.7 g/L kollagenáz H-val (Roche) és 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>-dal (37°C). A hepatocitákat 24-lyukú, el z leg I-es típusú kollagenázzal fedett (Sigma-Aldrich Ltd.) sejttenyészt csészékbe vittük DMEM tápoldatba, amely 1% MEM nem esszenciális aminosav oldatot tartalmazott, 0.05% inzulin, 0.1% penicillin-sztreptomycin, 10% fetális borjú szérum és 0.1% dexametazon jelenlétében.

---

<sup>1</sup> Le Cam A. Electroporation-mediated gene transfer into hepatocytes. Animal cell electroporation and electrofusion protocols. Volume 48, Totowa, NJ: Humana Press Inc; 1993. 141–150.



## Szepszis modell

Az endotoxikus sokk indukálásához BALB/c egereket kezeltünk intraperitoneálisan (i.p.) LPS-sel 20 mg/kg dózisban 250 µl mennyiségben. 4HQN-t (100 mg/kg) dózisban adtuk i.p. 250 µl mennyiségben háromszor egy nap az LPS kezelést egy nappal megelőzően, vagy egyszeri dózisban 1 vagy 6 órával az LPS kezelést követően. A kontroll egér azonos mennyiségű steril fiziológiás sóoldatot (PSS)-t kapott.

Az endotoxikus sokk indukálásához C57BL/6 egereket kezeltünk i.p. LPS-sel (20 mg/kg dózisban, *alacsony dózis* vagy 40 mg/kg *magas dózisban*). FA-det (6 mg/kg) minden 12 órában adtuk i.p., az első injekciót egy órával az LPS kezelés előtt. A kizárólag FA-del kezelt egerek (6mg/kg) FA-et, a kontroll állatok, azonos mennyiségű PSS-t kaptak.

Az egereket minden órában 84-órán keresztül monitoroztuk, figyelve az endotoxémia jeleit illetve az állatok pusztulását. Későbbi elhalálozást a kísérleti csoportjainkban már nem tapasztaltunk.

## Western blot

A Western blot analízishez BALB/c egereket előkezeltünk 100 mg/kg 4HQN-nal háromszor egy nap, egy nappal az LPS injekció előtt (20 mg/kg). Az állatok máját, tüdejét és lépét 6 órával az LPS kezelést követően eltávolítottuk, folyékony N<sub>2</sub>-ben fagyasztottuk és korábbiakban leírtak szerint (Veres *et al.* 2003<sup>2</sup>) feldolgoztuk.

C57BL/6 egereket előkezeltünk 6 mg/kg FA-dal 1 órával az LPS kezelés előtt (20 vagy 40 mg/kg). Az állatok máját 1.5 órával az LPS kezelést követően eltávolítottuk, folyékony N<sub>2</sub>-ben fagyasztottuk és a fentiek szerint feldolgoztuk. Az elsődleges antitesteket 4°C-on éjszakán át inkubáltuk 1:1000 hígításban. A másodlagos antitest toma-peroxidáz konjugált nyúl IgG volt. A peroxidáz jelölést a SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) rendszerrel vizualizáltuk.

## TNF , IL-1 , IL-6, IL-10 meghatározás

A kísérleti állatainkat a Western blot analízisnél leírtak szerint kezeltük. 1.5 és 3 órával az LPS kezelést követően vért vettünk, amit 0,5 órán keresztül szobahőmérsékleten tartottunk, hogy megalvadjon, majd 20 percig centrifugáltuk (2000xg). Továbbiakban a szérumot használva, belső különböző citokinek koncentrációját mértük. Ezen kísérleteinkben

---

<sup>2</sup> Veres B, Gallyas F Jr, Varbiro G, Berente Z, Osz E, Szekeres G, Szabo C, Sumegi B. Decrease of the inflammatory response and induction of the Akt/protein kinase B pathway by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 inhibitor in endotoxin-induced septic shock. *Biochem Pharmacol.* 2003 Apr 15;65(8):1373-82.

az LPS-t 20 mg/kg (alacsony) vagy 40 mg/kg (magas) dózisban alkalmaztuk. A szérumban TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 és IL-10 koncentráció változását a Quantikine M TNF $\alpha$  immunoassay kit (R&D Systems) és a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 ready-set-go kits (eBioscience) segítségével mértük. Az ELISA-kitteket a gyártók elírásai szerint használtuk.

### **NF- $\kappa$ B és AP-1/c-Fos aktiváció**

A kísérleti állatainkat a Western blot analízisnél leírtak szerint kezeltük. Sejtmag izolálásához májat, tüdőt és lépvet vettünk ki 1,5 órával az LPS kezelést követően, majd homogenizáltuk korábban leírtak szerint (Veres *et al*, 2003). Az NF- $\kappa$ B és AP-1/c-Fos aktiváció meghatározását a szövetekben Trans-AM<sup>TM</sup> Transcription Factor Assay Kit-tel végeztük (Active Motif, Rixensart, Belgium). Az ELISA-kitteket a gyártók elírásai szerint használtuk.

### **MRI analízis**

A kísérleti állatainkat a Western blot analízisnél leírtak szerint kezeltük. 6 órával az LPS kezelés után az egereket uretánnal (1.7 g/kg, i.p.) elaltattuk, majd egy epoxi-tartócsba helyeztük, a gyulladási választ T<sub>2</sub>-súlyozott képekkel vizualizáltuk. (Az NMR-készülék részletes leírását a disszertáció tartalmazza!)

### **ROS meghatározás**

A primér hepatociták médiumát dexametazonmentesre cseréltük majd a sejteket 5 mg/L LPS-sel és 50  $\mu$ g/L IFN $\gamma$  önmagában vagy FA-del (1-100  $\mu$ mol/L) kezeltük. 24 óra múlva 2,4-diklorodihidrofluorescein-diacetát oldatot adtunk a kezelt sejtek médiumához (C400, Invitrogen) 2 mg/L végső koncentrációban. 2 óra elteltével fluoreszcens intenzitást mértünk 485 nm excitációs és 555 nm emissziós hullámhossz mellett, Fluostar Optima (BMG Labtechnologies, Heidelberg, Germany) készülékkel.

### **Nitrit mérés**

A primér hepatociták médiumát dexametazonmentesre cseréltük, majd a sejteket 5 mg/L LPS-sel és 50  $\mu$ g/L interferon- $\gamma$ -val (IFN $\gamma$ ) önmagában vagy FA-del (1-100  $\mu$ mol/L)

kezeltük. 24 óra múlva  $\text{NO}_2^-$  koncentrációt mértünk Griess-Ilosvay-reagenssel (1% szulfanilamid, 0.1% naftiletiléndiamid, 5% foszforsavval) melyb 1 az 50  $\mu\text{L}$  médiumhoz avval megegyez mennyiséget adtunk, majd fényelnyelést mértünk 550 nm-en Anthos 2010 (Rosys, Wiena, Austria) microplate reader készülékkel.

### **Gyökfogó képesség mérés**

A dihidrorodamin1,2,3 redox festék oxidációját 10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  és 60  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Fe}^{2+}$ /EDTA jelenlétében indukáltuk. A kísérletben a FA és a rezveratrol (5-100  $\mu\text{mol/L}$ ) gyökfogó képességét hasonlítottuk össze, fluoreszcens intenzitást mérve 494 nm excitációs és 517 nm emissziós hullámhosszon az LS50B spektrofluoriméter (Perkin-Elmer Ltd, Budapest, Hungary) használatával.

### **Statisztikai analízis**

Adatainkat az átlag  $\pm$  átlag hibája (S.E.M.) formában prezentáltuk. Az átlagok összevetésére ANOVA-t alkalmaztunk. Néhány kísérleti felállásban a különböző LPS koncentrációk miatt (20 mg/kg és 40 mg/kg), adatainkat „egytényez s” vagy „több tényez s” ANOVA-val vizsgáltuk Bonferroni korrekció után. Ha az F-teszt egyenl tlen varianciát mutatott, Kruskal-Wallis-tesztet alkalmaztunk. A túlélési kísérletekhez, Mantel-Cox logrank tesztet használtunk. A mért különbségeket statisztikai értelemben szignifikánsnak tekintettük, ha  $P < 0.05$ .

## **Konklúzió**

A kísérleteinkben a 4HQN (*PARP inhibitor, elhanyagolható antioxidáns hatással*) és a FA (*kiváló antioxidáns, melynek nincs direkt hatása a PARP-ra*) hatását vizsgáltuk LPS-indukálta gyulladási folyamatokra BALB/c és C57BL/6 egérben.

1. Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a PARP aktiváció dönt en befolyásolja a szepszis patogenezisét, illetve a PARP nukleáris enzim gátlása jelent sen csökkentette a szepszis szempontjából legfontosabb transzkripciós faktor az NF- $\kappa$ B aktivációját a PI3K/Akt, ERK és p38-MAPK útvonalakon keresztül, szövetfügg módon.

2. Azt találtuk, hogy a FA, több polifenol mikrobiális degradációs terméke, antiinflammatorikus hatású, amely hatás a JNK és Akt útvonalak szabályozásán keresztül, az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor gátlásával és gyulladásos citokinek, TNF , IL-1 , IL-6, IL-10 szabályozásával valósul meg az egérben. A FA kiváló antioxidáns tulajdonsága, amit primér hepatocitákon és sejtmentes modellben is igazoltunk, valószínűleg döntően hozzájárul a gyulladáscsökkent hatáshoz. Így tehát azok a fenolsavak és -aldehidek, melyek különböző polifenolok degradációs termékei és jobb biológiai hozzáférhetőséggel „bioavailability” bírnak, mint az eredeti molekula, jelentősen hozzájárulhatnak az eddig az anyamolekulának tulajdonított antiinflammatorikus hatáshoz.

3. Eredményeink szerint a FA, egy antioxidáns és a 4HQN, egy PARP-inhibitor gátolták az LPS indukálta gyulladásos folyamatokat, azonban két teljesen különböző mechanizmussal. A 4HQN gátolta a PARP enzimet, mely transzkripciós koaktivátora az NF- $\kappa$ B-nek és fokozta az LPS indukálta Akt foszforilációt, amivel még aktívabbá tette ezt citoprotektív tulajdonságú útvonalat. Ezzel szemben a FA, valószínűleg a ROS és RNS molekulák eliminálásával és a proinflammatorikus JNK útvonal gátlásán keresztül védte ki az NF- $\kappa$ B aktivációt.

4. Azt találtuk, hogy az LPS, az Akt és JNK útvonalak aktivációját indukálta a C57BL/6 egerekben, míg a BALB/c egerekben ezt az aktivációt nem tudtuk kimutatni. Figyelembe véve ezen kináz útvonalak gyulladásban betöltött fontos szerepét, kísérleteink legalábbis részben, magyarázhatják a különböző egértörzsek eltérő LPS-sel szembeni érzékenységét.

Eredményeink a 4HQN és a FA hatásáról LPS indukálta endotoxikus sokkban megerősítik az általános képet az NF- $\kappa$ B gyulladásban betöltött szerepéről és új megvilágításba helyezik azokat a komplex jelátviteli folyamatokat melyek e transzkripciós faktor szabályozásához vezetnek.

# Publikáció

## - A témában közölt publikációk -

### Cikkek:

**Radnai B**, Tucsek Z, Bognar Z, Antus C, Mark L, Berente Z, Gallyas F Jr, Sumegi B, Veres B.: Ferulaldehyde, a water-soluble degradation product of polyphenols, inhibits the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mice. J Nutr. 2009 Feb;139(2):291-7. Epub 2008 Dec 23.

Veres B, **Radnai B**, Gallyas Jr F, Várbiro G, Berente Z, Ösz E, Sümegi B.: Effect of poly(ADP) ribose polymerase-1 inhibitor - 4-hydroxyquinazoline - on LPS-induced inflammation: modulation of kinase cascades and activation of transcription factors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2004 Jul;310(1):247-55. Epub 2004 Mar 03.

### Eladások:

**Radnai Balázs**: A ferulaldehid, egy polifenol degradációs termék hatása LPS indukálta endotoxikus sokkra egérben. Biológus Doktoranduszok Konferenciája. A Pécsi Akadémiai Bizottság Biológiai Tudományok Szakbizottságának rendezvénye, 2009. november 12-13.

Zsuzsanna Tucsek, **Balázs Radnai**, Tamas Dolowschiak, Janos Priber, Csenge Antus and Balázs Veres: Ferulaldehyde, a degradation product of polyphenols, inhibits the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mice and in RAW 264.7 cells. 13th Congress of the European Shock Society, Lisbon, Portugal, 24th-26th September 2009

**Radnai Balázs**, Tucsek Zsuzsanna, Hocsák Enik, Vet Sára, Németh Viktória, Bognár Eszter, Grász Dénes, Berente Zoltán, ifj.Gallyas Ferenc, Sümegi Balázs: A ferulaldehid hatása az LPS indukálta endotoxikus sokkra egerekben. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30- szeptember 2.

### Poszterek:

Tucsek Zsuzsanna, **Radnai Balázs**, Veres Balázs, Dolowschiák Tamás, Woth Gábor László, Pribér János, Schoenberg Markus és ifj.Gallyas Ferenc: A ferulaldehid hatása LPS-indukálta gyulladási folyamatokra egérben. 37. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2007. május 22-25.

F. Gallyas Jr., B. Veres, **B. Radnai**, E. Hocsák and B. Sumegi: Significant role of cytoprotective kinase signaling mechanisms in the protective effect of PARP inhibitors in a murine septic shock model. Budapest, Hungary, 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, 2-7 July, 2005

Veres B., **Radnai B.**, Gallyas F. Jr, Varbiro G., Berente Z., Ösz E., Sumegi B.: Effect of poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor – 4-hydroxyquinazoline – on LPS-induced inflammation: modulation of kinase cascades and activation of transcription factors.

Debrecen, Hungary, FEBS Advanced Course: Poly-ADP-ribosylation in health and disease. 2003. August 27-30.

Veres B., Tapodi A., **Radnai B.**, Varbiro G., Sumegi B.: A 4-hidroxykinazolin hatása ay LPS-indukálta szeptikus sokkra. Sümeg, XXXIII. Membrán-Transzport Konferencia, 2003. Május 21-24.

### *- További publikációk -*

#### **Könyvfejezet:**

Sumegi B., Kovacs K., Veres B., **Radnai B.**, Varbiro G., Bogнар Z., Toth A., Gallyas F. Jr.: Oxidative Stress and the Endoplasmatic Reticulum. In: Benedetti A., Banhegyi G., Burchell A. (Eds). Endoplasmatic reticulum: A metabolic compartment. IOS Press, pp.121-130. (2005)

#### **Cikkek:**

Bognar Z, Kalai T, Palfi A, Hanto K, Bognar B, Mark L, Szabo Z, Tapodi A, **Radnai B**, Sarszegi Z, Szanto A, Gallyas F Jr, Hideg K, Sumegi B, Varbiro G.: A novel SOD-mimetic permeability transition inhibitor agent protects ischemic heart by inhibiting both apoptotic and necrotic cell death. Free Radic. Biol. Med. 2006 Sep 1;41(5):835-48. Epub 2006 Jun 15.

#### **Eladások:**

Sümegi B., Kovács K., Tapodi A., Hantó K., **Radnai B.**, ifj. Gallyas F., Hocsák E., Hideg K.: Az ADP-riboziláció szerepe a PI3-kináz, Akt és MAPK jelátviteli útvonalak szabályozásában. Eger, XIII. Sejt és Fejlésbiológiai Napok, 2005. április 10-12.

Veres B., **Radnai B.**, Gallyas F. Jr, Varbiro G., Berente Z., Osz E., Sumegi B.: Effect of poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor – 4-hydroxyquinazoline – on LPS-induced inflammation: modulation of kinase cascades and activation of transcription factors. Pecs, IV. International Symposium on Myocardial Cytoprotection, 2003. szeptember 25-27.

#### **Poszterek:**

Zsuzsanna Tucsek, **Balazs Radnai**, Tamas Dolowschiak, Janos Priber, Csenge Antus and Balazs Veres: Ferulaldehyde, a degradation product of polyphenols, inhibits the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mice and in RAW 264.7 cells. 13th Congress of the European Shock Society, Lisbon, Portugal, 24th-26th September 2009

Zsuzsanna Tucsek, Tamas Dolowschiak, **Balazs Radnai**, Balazs Veres, Ferenc Gallyas Jr. and Balazs Sumegi: Effect of ferulaldehyde on inflammatory response in RAW macrophages and mice. 8th World Congress on Inflammation, Copenhagen, 16-20 June 2007.

Zsuzsanna Tucsek, **Balazs Radnai**, Zoltan Szabo, Tamas Dolowschiak, Eniko Hocsak, Aliz Szabo, Jr. Ferenc Gallyas, Tamas Lorand, and Balazs Sumegi: The effect of the IK11, an E - 4 - arylidene-3-isochromanone on the Hep G2 human hepatocellular carcinoma cell line. Semmelweis Symposium – Nitric Oxide and Nitrosative stress in the Cardiovascular System, Budapest, 2006. okt. 29-31.

**Balazs Radnai**, Zsuzsanna Tucsek, Balazs Veres, Katalin Hanto, Peter Jakus, Balazs Debreceni, Zita Bognar, Eniko Hocsak, Denes Grasz, Ferenc Gallyas Jr. and Balazs Sumegi: Effect of a PARP inhibitor, HO-3089 on the gene expression profiles of LPS stimulated RAW 264,7 murine macrophages. Semmelweis Symposium – Nitric Oxide and Nitrosative stress in the Cardiovascular System, Budapest, 2006. okt. 29-31.

Tucsek Zsuzsanna, **Radnai Balázs**, Szabó Zoltán, Dolowschiák Tamás, Hocsák Enik , Szabó Alíz, Solti Izabella, Bognár Eszter, Vet Sára, ifj.Gallyas Ferenc, Loránd Tamás és Sümegi Balázs: A PJ34 protektív hatása az IK11 indukálta oxidatív stresszben HepG2 sejtvonalon. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május 23-26.

**Radnai Balázs**, Tucsek Zsuzsanna, Szabó Zoltán, Dolowschiák Tamás, ifj.Gallyas Ferenc, Tamás Loránd és Sümegi Balázs Az IK11, egy E-4-arilidén-3-izokromanon hatása a Hep G2 humán hepatocelluláris karcinóma sejtvonalon. Magyar Szabadgyök-kutató Társaság III. Konferenciája, Debrecen, 2005. okt.13-15.

F. Gallyas Jr., Zita Bognar, **Balazs Radnai**, Antal Tapodi, Katalin Hantó, Aliz Szabó, Viktor Soma Poór, Peter Jakus, Gabor Várbiro, Balazs Sumegi: Poly-(ADP-ribose) polymerase inhibitors influence the taxol induced cell death in cultured cells. Gateshead, United Kingdom, Poly-(ADP-ribose) polymerase: Bench to bedside, 5-7 October, 2005.

**B. Radnai**, B. Veres, K. Hantó, P. Jakus, G. Varbiro, Z. Bognar, A. Tapodi, S. Veto, and B. Sumegi: The effect of a novel PARP inhibitor HO-3089 on the LPS stimulated RAW264,7 murine macrophage cells. Budapest, Hungary, 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, 2-7 July, 2005

K. Hantó, **B. Radnai**, Z. Bognar, V. Nemeth, G. Varbiro, A. Tapodi, F. Gallyas Jr., B. Sumegi and K. Toth: NF B dependent induction of COX-2 expression by amiodarone in liver cells. Budapest, Hungary, 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, 2-7 July, 2005

Z. Bognar, G. Varbiro, **B. Radnai**; A. Tapodi, K. Hanto, P.Jakus, F. Gallyas Jr and B. Sumegi: The effect of poly(ADP)ribose polymerase inhibitors on taxol induced cell death in cultured cells. Budapest, Hungary, 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, 2-7 July, 2005

**Radnai B.**, Veres B., Hantó K., Jakus P., Tapodi A., Várbiro G., Bognár Z., Vet S. és Sümegi B.: Egy új PARP-gátló szer a HO-3089 hatása az LPS stimulálta egér makrofág sejtvonalon. Eger, XIII. Sejt és Fejlésbiológiai Napok, 2005. április 10-12.

**Radnai B.**, Veres B., Várbiro G., Tapodi A., Bognár Z., Sümegi B.: A poli-(ADP-ribóz)-polimeráz gátlás hatása az endotoxin stimulálta egér makrofág sejtvonalon XXXIV. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2004. június 1-4.

**Radnai B.**, Veres B., Várbiró G., Tapodi A., Bognár Z., Sümegi B.: The role of 4-HQN - a PARP-1 inhibitor - on LPS stimulated murine macrophage cells. Dubrovnik, Croatia, FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference, May 21-27, 2004

Bognar Z., Varbiro G., Palfi A., Veres B., Tapodi A., **Radnai B.**, Sumegi B.: An amiodarone analogue, HO3538 protects ischemic hearts by inhibiting the mitochondrial apoptotic pathway. Istanbul, Turkey. 4th European Workshop on Cell Death. 2004. May 11-16.

Varbiro G., Bognar Z., Veres B., Tapodi A., **Radnai B.**, Sumegi B.: Phosphatidic acid induces permeability transition and the collapse of the membrane potential in isolated rat liver mitochondria. Istanbul, Turkey. 4th European Workshop on Cell Death. 2004. May 11-16.

## Köszönetnyilvánítás

Munkánkat az OTKA T034320, Egészségügyi Szociális és Családügyi Minisztérium ETT 559/2003, Biotech BIO-00004/2002, FKFP 0167/2001 és 0168/2001, Bolyai BO/00166/01, BO/00170/01 és a Welcome Trust 059917 támogatták.

Köszönettel tartozunk Dr. Sümegi Balázs és Dr. Gallyas Ferenc Professzor uraknak, akik gyakorlati tanácsaikkal és gondolatébresztő ötleteikkel segítették munkánkat, illetve lehetővé tették, hogy kísérleteinket a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben végezhessük.

Köszönöm kollégáimnak Tucsek Zsuzsannának és Dr. Veres Balázsnak, akikkel vidám és baráti hangulatban telt a laborban töltött időm.

Köszönöm Halász Helena, Pásztor Istvánné Anna, Girán László és Horváth Bertalan asszisztensek segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Dr. Hideg Kálmán Professzor úrnak, aki a Szerves és Gyógyszertani Intézetben a ferulaldehid vegyületet szintetizálta és számunkra kísérleteinkhez biztosította.