

**EGY POTENCIÁLIS ANTIINFLAMMATORIKUS**

**CÉLPONT:**

**A MAKROFÁG MIGRÁCIÓ INHIBITOR FAKTOR**

**ENZIMATIKUS AKTIVITÁSA**

Doktori (PhD) – értekezés

**BÍRÓNÉ DR. MOLNÁR VALÉRIA**

**Prof. Dr. Szolcsányi János**  
Doktori Iskola vezető

**Prof. Dr. Szelényi Zoltán**  
Programvezető

**Dr. Garai János**  
Témavezető

**Pécsi Tudományegyetem**  
**Általános Orvostudományi Kar**

**2006.**

# Tartalomjegyzék

1	A Makrofág migráció inhibitor faktor (MIF) .....	4
1.1	Történeti áttekintés .....	4
1.2	A MIF szerkezete .....	5
1.3	A MIF hatásmechanizmusa .....	7
1.4	A MIF, mint citokin .....	9
1.5	A MIF, mint endokrin faktor .....	10
1.6	A MIF, mint enzim .....	13
1.7	A MIF szerepe a daganatok képződésében.....	16
1.8	A MIF szerepe egyes kórállapotokban .....	17
1.8.1	A MIF szerepe rheumatoid arthritisben .....	19
1.8.2	A MIF szerepe endometriosisban .....	21
1.9	A MIF szerepe az anyagcserében .....	22
2	Anyagok.....	24
2.1	Eszközök, műszerek.....	24
2.2	Antitestek, enzim, molekula standard, ELISA kitek .....	24
2.3	Pufferek, oldatok.....	25
3	Módszerek.....	29
3.1	Fehérje módszerek, tisztítások.....	29
3.1.1	Fehérje meghatározás Bradford fotometriás módszerrel .....	29
3.1.2	SDS-poliakrilamid gélelektroforézis .....	29
3.1.3	Western Blot .....	29
3.1.4	Ezüstözés .....	30
3.1.5	Tubulin izolálás.....	30
3.1.6	HM- tubulin tisztítási módszer .....	31
3.1.7	Ízületi homogenizátum készítése .....	31
3.2	Kémiai vegyületek előállítása.....	32
3.3	Immunológiai módszerek .....	32
3.3.1	ELISA módszer (MIF ELISA) .....	32
3.3.2	TR-FIA, DELFIA módszer.....	33
3.4	Bioaktivitás tesztek .....	33
3.4.1	Fenilpiruvát tautomeráz aktivitás.....	33
3.4.2	Tubulin polimerizáció.....	34
3.5	Immunhisztokémia.....	35
3.5.1	Fénymikroszkópos immunhisztokémia paraffinba ágyazott metszeteken 35	
3.5.2	Fénymikroszkópos immunhisztokémia úsztatott metszeteken .....	35
3.5.3	Elektronmikroszkópos immunhisztokémia.....	36
3.6	Állatkísérletes módszerek .....	37
3.6.1	Állatok .....	37
3.6.2	Komplett Freund adjuváns (CFA) indukált arthritis modell.....	37
3.6.3	Lábduzzadás mérése .....	37
3.6.4	Mechanonociceptív küszöb mérése .....	38

4	Kérdésfelvetések, vizsgálatok és eredmények.....	39
4.1	Egyes gyulladásgátló molekulák befolyásolják a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitását.....	39
4.2	Kémiai úton szintetizált kismolekulák hatása a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitására.....	43
4.3	Ketontestek hatása a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitására.....	46
4.4	Egyes lipopoliszacharidok befolyásolják a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitását.....	48
4.5	Flavonoidok és fitoösztrogének befolyásolják a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitását.....	50
4.6	MIF mennyiségének és aktivitásának vizsgálata humán mintákban .....	54
4.6.1	MIF mennyisége és aktivitása ízületi gyulladásban szenvedők ízületi folyadékában és szérumban .....	55
4.6.2	MIF mennyisége és aktivitása humán endometriosisos betegek peritonealis folyadékában .....	59
4.6.3	MIF szérum szintjének változása laparotomián átesett betegekben .....	63
4.7	A hatékony MIF gátló kávésav hatásainak vizsgálata <i>in vivo</i> egér arthritis modellben.....	67
4.8	Mikrotubulus funkció és MIF kapcsolatának vizsgálata .....	70
4.9	Postmenopausalis osteoporosis prevenciója növényi ösztrogénekkal .....	81
5	Összefoglalás .....	89
6	Rövidítések .....	93
7	Táblázatok.....	96
8	Ábrajegyzék.....	101
9	Irodalomjegyzék .....	103
10	A dolgozat témáját adó publikációk listája.....	119
10.1	Közlemények .....	119
10.2	Idézhető absztraktok .....	119
10.3	Konferencia előadások, poszterek listája.....	120
10.3.1	Előadások.....	120
10.3.2	Poszterek.....	121
11	Köszönetnyilvánítás.....	123

# 1 A Makrofág migráció inhibitor faktor (MIF)

## 1.1 Történeti áttekintés

1932-ben Rich és Lewis tuberkulinnal kezelt szövetkultúrát vizsgálva antigén által gátolt leukocita és makrofág migrációt talált. Ebből arra következtettek, hogy az antigének a lymphocytákat ún. migrációgátló faktor termelésére készítetik (Rich és Lewis, 1932). Az, hogy kapilláriscsövekben lehetővé vált a mononukleáris sejtek migrációjának mérése (George és Vaughan, 1962) 1966-ban elvezetett a makrofág migráció inhibitor faktor (MIF) leírásához (Bloom és Bennett, 1966; David, 1966). David valamint Bloom és Bennett kutatócsoportja egymástól függetlenül kimutatta, hogy a sejtes immunreakciókat, mint a késői típusú hiperszenzitivitást (delayed-type hypersensitivity, DTH), többek közt az aktivált T sejtek által termelt MIF hozza létre.

A MIF volt az első, *in vivo* kísérletekkel igazolhatóan nem immunglobulin szerkezetű immunmediátor. Ennek ellenére, a következő 25 évben néhány erőfeszítéstől eltekintve, relatív keveset publikáltak róla. Ebben az időszakban fedezték fel, hogy a MIF a makrofágokban nemcsak migráció gátlást okoz, hanem képes fokozni a makrofágok felszíni adhézióját és a fagocitózist is (Nathan és mtsai, 1971; Nathan és mtsai, 1973).

Probléma volt, hogy sokáig nem találtak elegendő MIF forrást ahhoz, hogy megfejtsék az elsődleges szekvenciát, melynek segítségével klónozhatták volna a tisztított fehérjét. A kutatók jó ideig kénytelenek voltak ezért leukocita kultúrákat használni, melyek szennyezettek voltak, és MIF-et csak csekély mértékben tartalmaztak. A szennyezőanyagok hamis eredményekhez és néhány publikáció (David, 1993) visszavonásához vezettek. Ez a tény, valamint egyéb migrációgátló hatással is rendelkező mediátor, mint az interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) (Thurman és mtsai, 1985) és az interleukin-4 (IL-4) (McInnes és Rennick, 1988) felfedezése ismét érdekessé tette a MIF-et. De a kutatás középpontjába csak a humán MIF c-DNS-ének sikeres klónozása után (Weiser és mtsai, 1989) került. A végleges áttörést a fehérje rekombináns előállítása jelentette 1993-ban (Bernhagen és mtsai, 1993), mely nagy mennyiségű, tiszta MIF-et szolgáltatott a biológiai funkciók teszteléséhez. Jelenleg a MIF-nek már számos funkciójáról vannak ismereteink, melyek túlmutatnak a makrofágok migrációját gátló hatásán. Ennek ellenére a név változatlan formában fennmaradt.

## 1.2 A MIF szerkezete

A humán MIF monomer 114 aminosavból áll. Háromdimenziós szerkezetét röntgenszerkezeti analízissel vizsgálták, amelynek segítségével láthatóvá vált, hogy a MIF, három azonos alegységből felépülő homotrimer molekula (Sun és mtsai, 1996; Suzuki és mtsai, 1996a).



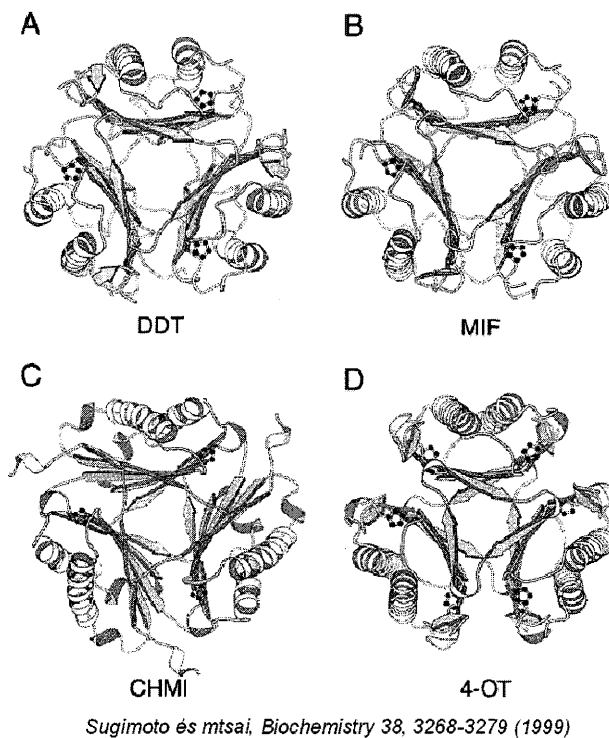
*Lolis, Current Opinion in Pharmacology 1, 662–668 (2001)*

### 1.2.1. ábra A MIF szalagos szerkezete

A trimer úgy rendeződik, hogy három  $\beta$ -lemezt hat  $\alpha$ -hélix vesz körül egy csatornát képezve, mely végighúzódik a teljes molekulán. A csatorna belsejére pozitív elektromos potenciál jellemző, mely negatív reakciópartnerekkel kapcsolatot teremthet. Háromdimenziós szerkezetét a monomerek közti hidrogén hidak és egy hidrofób mag stabilizálja.

A MIF háromdimenziós szerkezete nem mutat semmiféle hasonlóságot sem a többi citokinnel, sem a hipofizishormonokkal, és így egy új protein szupercsaládot képez. Ismert azonban néhány fehérje, amely szerkezetileg hasonlatos a MIF-hez, ilyen a dopachrom-tautomeráz (Sugimoto és mtsai, 1997), valamint a prokarióta enzimek közül a 4-oxalokrotonát-tautomeráz (4-OT), 5-karboximetil-2-hidroximukonát-izomeráz (CHMI) és a korizmát-mutáz (Chook és mtsai, 1994; Subramanya és mtsai, 1996; Sun és mtsai, 1996). Ezen enzimek a MIF-hez hasonlóan homotrimer, vagy mint a 4-OT homodimerekből álló homotrimer molekulák. A szerkezeti hasonlóságon felül szekvenciahomológia is látható. A MIF és a D-dopachrom-tautomeráz között 27 % szekvencia azonosság van (Zhang és mtsai, 1995), bár a MIF és a bakteriális enzimek

szekveniahomológiája alacsonyabb (~ 20%), a 4-OT és a CHMI N-terminális végén a MIF-hez hasonlóan katalitikus prolin alegység található (Swope és mtsai, 1998).



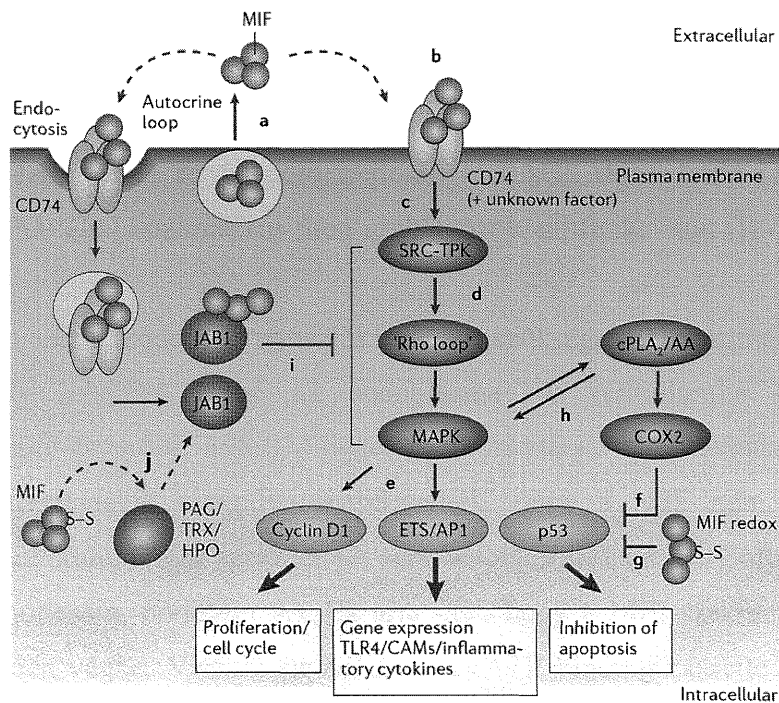
### 1.2.2. ábra Hasonlóság a bakteriális enzimekre

A MIF aminosav szekvenciája különböző fajokban nagy homológiát mutat, pl. az emlősök között a homológia 90% körüli (Calandra és Roger, 2003). A humán és egér MIF elsődleges szekvenciája is 89%-ban homológ (Bernhagen és mtsai, 1994), azonban az emberben egyetlen funkcionáló gén van jelen, mely három exonból és két intronból épül fel, egérben több mint 10 pszeudogén található (Paralkar és Wistow, 1994; Bozza és mtsai, 1995; Kozak és mtsai, 1995; Mitchell és mtsai, 1995). A kódoló genom DNS szintjén mindkettő nagy homológiát mutat. Egy 0,6 kb. hosszú mRNS-transzkript egerekre és emberekre egyaránt jellemző (Bernhagen és mtsai, 1998).

A MIF molekulásúlya 12,5 kDa. Ismert, hogy emberben (Kato és mtsai, 1996; Sugimoto és mtsai, 1996; Sun és mtsai, 1996) és patkányban (Suzuki és mtsai, 1996b) röntgenszerkezeti analízissel vizsgálva trimert képez. Ezzel szemben más módszerekkel, például NMR-rel (Muhlhahn és mtsai, 1996) és gélfiltrációval (Zeng és mtsai, 1993) a humán MIF-et dimer szerkezetűnek találták. Újabb szedimentációs kísérletek eredményei viszont ismét trimerre utalnak (Philo és mtsai, 2004). Máig nem tisztázott azonban, hogy a MIF *in vivo* milyen oligomerizációs állapotban van jelen.

### 1.3 A MIF hatásmechanizmusa

A makrofág migráció inhibitor faktor extracellulárisan kötődve, receptor-mediált jelátvivő utakon keresztül és -endocytosisal a sejtbe jutva- intracelluláris kölcsönhatások révén is szabályozza a sejtaktivitást (lásd az 1.3.1 ábrát).



Morand és mtsai, *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 399-411 (2006)

#### 1.3.1. ábra A MIF hatásmechanizmusa

Az extracelluláris MIF, mely magába foglalja a sejten belüli raktárakból felszabaduló MIF-et, autokrin módon (a) lép kapcsolatba a sejt felszíni CD74-gyel (b). A MIF aktiválja a CD74 függő extracelluláris szignál-reguláló kináz 1/2 (ERK1/2) és a p38 mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) utakat (b, c). A MIF és a CD74 közti kapcsolatot szabályozó fehérjék és az ezt követő sejten belüli lépések még tisztázatlanok (c). A további lépések közé tartozik a SRC-családba tartozó tirozin protein kináz, valamint a Rho GTP-áz-Rho kináz-miozin könnyűlánc kináz (MLCK) – integrin- fokális adhéziós kináz (FAK) aktivációs sor (d), amely többféle hatást eredményez: egyrészt a cyclin D1 aktivációját, mely proliferációt indukál, másrészt az ETS domain-t tartalmazó transzkripciós faktorok és aktivátor-protein 1 (AP1) transzkripciós faktorok aktivációját, mely sejt-adhéziós molekulák (CAM) és a Toll-like receptor 4 (TLR4) gén expressziójához vezet (e). A MIF p53-függő apoptózis gátló hatása szintén a MIF-CD74 interakción keresztül valósul meg. Az apoptózis indukciója

magába foglalja a citoplazmatikus foszfolipáz A2 (cPLA<sub>2</sub>) aktivációját, az arachidonsav (AA) képződést és a ciklooxygenáz 2 (COX2) aktivációját **(f)**. A prooxidatív stressz hatására elinduló apoptózist a MIF antioxidáns aktivitása gátolja, mely a sejtek közti diszulfid (S-S) kötések redukciójával függ össze **(g)**. Az arachidonsav viszont képes aktiválni a MAPK-t és az AP1-regulált génexpressziót **(h)**. Bizonyos intracelluláris fehérjék közvetlenül kapcsolatban állnak a MIF-fel. Ha sok MIF kerül be endocytosissal a sejtbe, hozzákötődik a c-Jun activation domain binding protein 1-hez (JAB1), ezzel gátolja a MAPK-n keresztül zajló jelátviteli utakat **(i)**. Az intracelluláris MIF szintén szabályozhatja a JAB1-et és egyéb peroxiredoxin 1 (PAG), thioredoxin (TRX) vagy hepatopoietin (HPO) által enzimatis úton szabályozott sejtfunciókat **(j)** (Morand és mtsai, 2006).

A MIF-gén nem kódol a transzlokációhoz szükséges N-terminális szignál szekvenciát, mely lehetővé tenné az endoplazmatikus retikulumba (ER) való transzportot (Weiser és mtsai, 1989). Flieger és munkatársai endotoxinnal stimulált THP-1 típusú monocytákat vizsgálva megfigyelték, hogy a MIF nem jut be az endoplazmatikus retikulumba és szekrécióját sem befolyásolják az ER/Golgi útvonalat gátló anyagok (monensin, brefeldin A). Ez arra utal, hogy a MIF szekréciója nem a klasszikus úton megy végbe. Viszont az ABCA1-et (ATP binding cassette transporter subfamily A1) gátló glyburid és probenicid nagymértékben gátolta a MIF szekrécióját, de nem befolyásolta a MIF szintézisét, ami azt feltételezi, hogy a MIF szekréciója az ABCA1 transzporter segítségével zajlik (Flieger és mtsai, 2003). A citoplazmán kívül kimutatható a kis vezikulumokban (Nishino és mtsai, 1995; Eickhoff és mtsai, 2001) és a sejtmagban is (Burger-Kentischer és mtsai, 2002; Pyle és mtsai 2003), azonban az még nem tisztázott, hogy miképpen kerül be a sejtmagba.

Bár a MIF hatásmechanizmusa még nem teljesen tisztázott, más proinflammatorikus proteinekhez hasonlóan képes synoviocytákban aktiválni a MAPK-kat, így az extracelluláris szignál-reguláló kinázt (ERK) és a p38 MAPK-t (Onodera és mtsai, 2004; Santos és mtsai, 2004). Eddig a MIF az egyetlen citokin, mely közvetlenül downregulálja a p53 expresszióját és funkcióját (Hudson és mtsai, 1999; Mitchell és mtsai, 2002; Leech és mtsai, 2003; Lacey és mtsai, 2003). Ezzel kapcsolatban kimutatták, hogy p53 hiány esetén a rheumatoid arthritis súlyosabb képet mutat (Simelyte és mtsai, 2005).



## 1.4 A MIF, mint citokin

MIF-et 1966-ban az első citokinek között fedezték fel, és sokáig olyan T-sejt specifikus citokinnek számított, mely a makrofágok migrációját gátolja (Bloom és Bennett, 1966; David, 1966). Ma már számos hatásmechanizmusa és képzési helye ismert, mégis nehéz a MIF-et klasszifikálni, hiszen a citokin funkció mellett rendelkezik hormonokra és enzimekre jellemző tulajdonságokkal is. Mindezek ellenére, számos proinflammatorikus tulajdonsága miatt a legtöbb közlemény citokinként említi.

A MIF forrásai nagyon változatosak. Gyakorlatilag az egész szervezetben megtalálható, az immunrendszer sejtjeitől kezdve, a hipofízis kortikotrop sejtjein át, az endothel sejtekig (Calandra és Roger, 2003). A MIF egyrészt intracelluláris vezikulumokban található, melyből bizonyos stimulusok hatására szabadul ki, másrészt emberben és rágcsálókban 3 – 5 ng/ml koncentrációban a vérben is megtalálható (Metz és Bucala, 1997). Mindkét jellemvonásban különbözik a többi proinflammatorikus citokintól, hiszen azoknak egy stimulust követően először szintetizálódni kell és nincs állandó vérszintjük sem (Baugh és Bucala, 2002).

A MIF egyik legfontosabb forrását maguk a makrofágok jelentik, melyeket eredetileg csak a MIF hatás célsejtjeinek tartottak. Később felismerték, hogy bizonyos stimulusok hatására a makrofágokból is felszabadul a MIF. Ilyen stimulusok lehetnek a bakteriális endo- és exotoxinok, mint pl. a lipopoliszacharid (LPS), a toxikus shock syndrome toxin-1 (TSST-1) és a streptococcalis pirogén exotoxin A (SPEA). De egyéb proinflammatorikus effektormolekula, mint pl. a tumor necrosis factor (TNF) és interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) hatására is felszabadul (Calandra és mtsai, 1994; Calandra és mtsai, 1998).

A stimulusok hatására szecernált MIF mennyisége harang alakú dózisfüggést mutat. Szabaddá válását követően klasszikus citokinként viselkedik, azaz immunsejteket aktivál. Ezt jelzi a növekvő lymphocyta proliferáció és a makrofágok megemelkedett fagocitózisa (Nathan és mtsai, 1971; Bacher és mtsai, 1996) valamint a makrofágok és neutrofilek apoptózisának gátlása (Mitchell és mtsai, 2002; Baumann és mtsai, 2003). Mindezen tulajdonságok az immunválasz javításához vezetnek.

A gyulladás kezdetén megemelkedett szöveti és szérumban MIF szint viszont káros következményekhez is vezethet. Ezt mutatják azok az állatkísérletek, melyekben a nem letális peritonitis nagy dózisu MIF-fel kombinálva megnövelte az állatok mortalitását (Calandra és mtsai, 2000). Önmagában a nagy dózisu MIF injekció nem vezetett az

egerek halálához, szemben például a TNF-fel, ahol a magasabb dózis letális volt (Kettelhut és mtsai, 1987). A MIF proinflammatorikus hatása akut gyulladás alatt számos gyulladást elősegítő faktor, mint a TNF, IL-6, nitrogénoxid (NO) és arachidonsav metabolizmus termékeinek stimulálásával valósul meg (Bernhagen és mtsai, 1994; Calandra és mtsai, 1995; Mitchell és mtsai, 1999). Proinflammatorikus hatás mellett a MIF az antiinflammatorikus glükokortikoidok természetes ellenregulátora. Ez azt jelenti, hogy a MIF a glükokortikoidok által indukált proinflammatorikus molekulákra TNF, IL-1, IL-6, IL-8 vonatkozó gátlást érvényteleníti (Calandra és mtsai, 1995).

A fentiek szerint a MIF-nek számos olyan jellemzője van, ami miatt citokinként említhetjük, ugyanakkor néhány azoktól eltérő tulajdonsága is van. A citokinek egyik legfontosabb jellemzője, hogy a célsejt felszínén specifikus receptorral rendelkeznek. A receptorhoz való kötődés szignáltranszdukció (esetleg a géntranszkripció) aktiválódásához és sejthatásokhoz vezet. Azonban több évtized intenzív kutatásai ellenére sem találták meg a MIF *bona fide* receptorát. Az MHC II nem variáns láncát -a CD-74-gyet - potenciális receptorként azonosították (Leng és mtsai, 2003). A sejtben a CD-74 szabályozza az MHC II fehérjék transzportját az endoplazmatikus retikulumtól a Golgi felé (Cresswell, 1994). Ennek ellenére az összes CD-74 2-5%-a a sejtfelszínen van jelen (Sant és mtsai, 1985; Wraight és mtsai, 1990). Ezen ismeretek ellenére tisztázásra vár, hogy a CD-74 valóban a MIF receptoraként, avagy csak sejthatást nem okozó, kötődést elősegítő molekulaként funkcionál-e („*A MIF hatásmechanizmusa*” c. rész)

## 1.5 A MIF, mint endokrin faktor

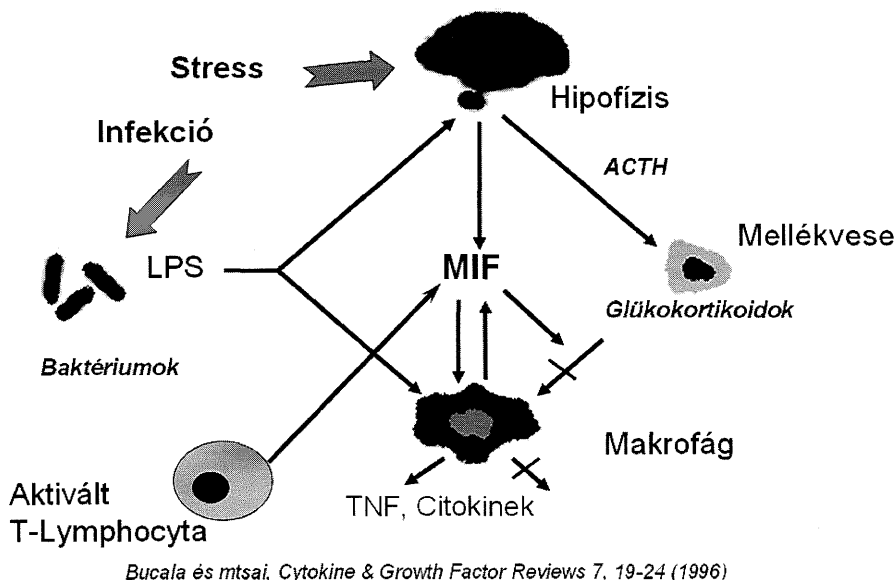
A MIF endokrin faktor is, mert a hipofízis kortikotrop sejtjei is szecernálják (Bernhagen és mtsai, 1993). LPS stimulust követően szecernálódik a hipofízisből, és proinflammatorikus tulajdonságainál fogva feltételezhető volt, hogy ezzel hozzájárul az immunvédekezéshez (Bernhagen és mtsai, 1994). További tanulmányok szerint, a MIF a hypothalamus-hipofízis-mellékvesekéreg (HPA-Hypothalamus, Pituitary gland, Adrenal gland) tengely minden lépcsőjében szecernálódik. A hypothalamus neuronjaiban megtalálták a MIF-fehérjét és mRNS-t (Bacher és mtsai, 1998); a hipofízis sejtekben szekretoros vezikulákban található, az adrenokortikotrop- (ACTH) és a thyreotrop

hormonhoz (TSH) hasonlóan (Nishino és mtsai, 1995). Immuncitokémiai és ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) adatok arra utalnak, hogy a MIF a hipofízis teljes fehérjetartalmának 0.5 %-át adja (Bernhagen és mtsai, 1993). Ez a mennyiség megegyezik az ACTH és prolaktin hipofízis hormonokéval. A MIF expresszióját és a hipofízissejtekből való felszabadulását a CRF (corticotropin-releasing factor) indukálja (Waeber és mtsai, 1998). Rágcsálókban a MIF mRNS-t és -fehérjét a mellékvese kéregben is megtalálták (Bacher és mtsai, 1997). Azonban egy humán tanulmányban ACTH szekretogok, vagy exogén glükokortikoidok nem befolyásolták a MIF koncentrációját (Isidori és mtsai, 2002). MIF hiányos egerekből származó peritonealis makrofágok viszont érzékenyebbé váltak a glükokortikoidokra (Aeberli és mtsai, 2006).

A szérumban MIF tartalma egészséges emberekben is relatív magas (3–5 ng/ml) (Metz és Bucala, 1997). Szisztémás koncentrációja cirkadián ritmust mutat. Reggel hét órakor éri el maximumát, azaz a kortizolhoz hasonlóan változik (Petrovsky és mtsai, 2003). Szisztémás LPS injekció hatására szecernálódik a hipofízisből, amit a MIF plazmaszintjének gyors emelkedése és a HPA szövetekben mért MIF koncentráció csökkenése igazol (Bernhagen és mtsai, 1993). A HPA tengely sejtjeiben a MIF *de novo* szintézise valamennyivel később kezdődik, amire a megemelkedett mRNS mennyiség utal. Ezt az LPS-re adott válaszreakciót, tehát a szöveti MIF tartalom csökkenését és a *de novo* szintézist, más MIF tartalmú szövetekben is megfigyelhetjük (Bacher és mtsai, 1997). Glükokortikoid kezelés hatására is hasonlóan történik a MIF felszabadulása. Egy *in vitro* kísérlet szerint a makrofágokat a kortizol, ill. dexamethason kezelés MIF termelésre és felszabadulásra készítette (Calandra és mtsai, 1995; Bacher és mtsai, 1996). A makrofágok MIF termelésének dózis-hatás görbéje glükokortikoid stimulus hatására harang alakú, és ugyanezt mutatja egyéb stimulusok hatására is, azaz a maximális felszabadulás csekély stimulációval érhető el. Ez a jelenség azonban nemcsak makrofágokra jellemző, mert ugyanezt figyelték meg synoviocytaiban is (Leech és mtsai, 1999).

Annak ellenére, hogy a citokineket a glükokortikoidok általában serkentik (Wiley és mtsai, 2004), a MIF-nél ellentétes hatásokat figyeltek meg. Bár a MIF ACTH-val szinkron szekretálódik a hipofízis sejtéből, illetve glükokortikoid hatására fokozódik a makrofágok MIF szekréciója; a MIF az antiinflammatorikus hatású glükokortikoidok hatását ellensúlyozza. *In vitro* a monocytákban, glükokortikoid hatására mérséklődött a gyulladáshoz vezető citokin koncentráció emelkedése (Calandra és

mtsai, 1995). *In vivo* arthritis modellben és endotoxinaemiában a MIF injekció megszüntette a glükokortikoid védő hatását (Calandra és mtsai, 1995; Santos és mtsai, 2001).



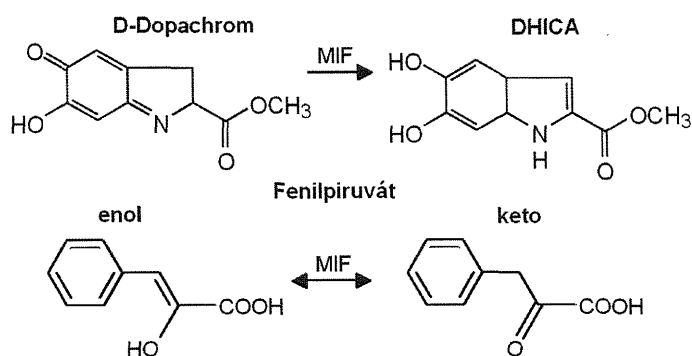
**1.5.1. ábra MIF glükokortikoid ellenreguláció**

Azonban máig nem tisztázott, hogy akadályozza meg a MIF a glükokortikoid ezen hatásait. Egy lehetséges magyarázat szerint a MIF glükokortikoid ellenreguláló szerepe az ERK-1/2 kináz aktiválásán keresztül valósulhat meg (Mitchell és mtsai, 1999). Az aktivált ERK nagyszámú citoszolikus fehérjét és transzkripciós faktort foszforilál, például a cPLA<sub>2</sub>-t (citoplazmatikus foszfolipáz A<sub>2</sub>). A cPLA<sub>2</sub> a proinflammatorikus kaszkád fontos komponense, terméke az arachidonsav, mely a prosztaglandinok és leukotriének előanyaga. A cPLA<sub>2</sub> a glükokortikoidok antiinflammatorikus hatásának fontos intracelluláris célpontja. Ezért a MIF által indukált cPLA<sub>2</sub> aktiválás lehet az egyik mechanizmus, mely által a MIF a glükokortikoidok immunszuppressziós hatását megszünteti. Ezt L929 fibroblastokon bizonyították be, melyekben a MIF a glükokortikoidok arachidonsav felszabadulását, gátló hatását meg tudta szüntetni (Mitchell és mtsai, 1999). A közelmúlt közleményei szerint, a MIF glükokortikoid ellenreguláció, és a sejtek glükokortikoid „érzékenyítése” molekuláris szinten részben a MAPK foszfatáz-1 révén valósul meg (Roger és mtsai, 2005; Aeberli és mtsai, 2006).

## 1.6 A MIF, mint enzim

A MIF a citokinek között egyedülálló módon két evolúcionálisan konzervált motívumot tartalmaz, melyhez hasonlókat csak a bakteriális enzimekben azonosítottak. Ezen motívumok *in vitro* izomerizációs/tautomerizációs és oxidációs-redukációs reakciókat katalizálnak (Rosengren és mtsai, 1996; Rosengren és mtsai, 1997; Kleemann és mtsai, 1998; Swope és mtsai, 1998, Thiele és Bernhagen, 2005).

A MIF tautomeráz aktivitását véletlenül fedezték fel a melanin bioszintézisének vizsgálata közben. A melanocitákban a melanin bioszintéziséhez a *L*-dopachrom enzimátikus átalakulását 5,6-dihidroxi-indol-2-karboxisavvá (DHICA) a *L*-dopachrom tautomeráz enzim katalizálja, mely a tirozináz enzimsalád tagja. Az enzimaktivitás mérésekor negatív kontrollként a nem fiziológias *D*-dopachromot használták a szubsztrát helyett. A kutatók meglepetésére a melanocita-lizátumban két enzim is jelen volt, melyek a *D*-dopachromot átalakíthatják. Ezt a két enzimet szekvenencia analízissel *D*-dopachrom-tautomeráz és MIF fehérjében azonosították (Zhang és mtsai, 1995).



1.6.1. ábra A tautomeráz reakció szubsztrátjai

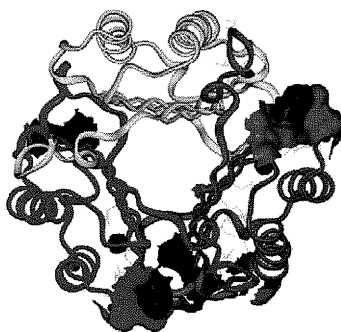
Újabb szubsztrátokat is találtak a MIF enzimaktivitásához: a fenilpiruvátot (PP) és a hidroxifenilpiruvátot (OH-PP) (Rosengren és mtsai, 1997) melyek keto-enol tautomerizációját katalizálja ez a citokin. Mivel azonban e fiziológiasan előforduló szubsztrátok Michaelis-állandója ( $K_m$ ) túl magas a szervezetben található koncentrációhoz képest, ezért nem valószínű, hogy a MIF természetes szubsztrátjaként funkcionálnának. A MIF természetes szubsztrátjai közé tartoznak a katecholaminok anyagcseretermékei is. A MIF képes a neurontranszmitter katecholamin 3,4-dihidroxi-fenilamin és a noradrenalin toxikus quinontermékeit a 3,4-dihidroxi-fenilaminokromot és a norepinefrinokromot, indoldihidroxi származékokká átalakítani (Matsunaga és

mtsai, 1999a; Matsunaga és mtsai, 1999b). Ezáltal a MIF a catecholamin lebomlási termékek detoxifikálásában is szerepet játszhat.

További enzimikus hatására a MIF szekvenciából következtek, ugyanis a Cys-X-X-Cys motívum a thiol-protein-oxidoreduktázokra jellemző. Oxidoreduktáz aktivitása a konzervált ciszteinek közti diszulfidhidak képződését és redukcióját katalizálja. Ezt az aktivitást inzulin-diszulfid és 2-hidroxietyl-diszulfid MIF-fel történő redukálásával lehet monitorozni (Kleemann és mtsai, 1998).

A tautomeráz aktivitás egy ősi evolúciós sajátosság, melyet a törzsfajlás korai szakában az organizmusok feltehetően komplex molekulák szintetizálásakor hasznosítottak, de arra egyelőre nincs bizonyítékunk, hogy a modern fajok a szintetizáló utak során vajon használják-e ezt a tautomeráz aktivitást vagy sem (Al-Abed és mtsai, 2005). Így jelenleg még nem tisztázott a MIF tautomeráz katalitikus aktivitásának *in vivo* betöltött molekuláris szerepe. Különböző laboratóriumok egybehangozóan igazolják, hogy az enzimikus funkcióhoz elengedhetetlen a konzervált katalitikus aktív centrum, nevezetesen az amino- (N) terminális prolin, bár ennek relevanciája a biológiai funkció tekintetében vitatott (Bendrat és mtsai, 1997; Kleemann és mtsai, 1998; Swope és mtsai, 1998; Stamps és mtsai, 1998; Hermanowski-Vosatka és mtsai, 1999; Lubetsky és mtsai, 1999; Kleemann és mtsai, 1999; Kleemann és mtsai, 2000).

Bizonyított, hogy a MIF homotrimer harmadlagos szerkezete szükséges a tautomeráz katalitikus régió felépüléséhez, mely egyben az alapját képezheti a MIF és a CD74 extracelluláris doménje közti interakciónak is (Jasanoff és mtsai, 1998; Leng és mtsai, 2003; Meyer-Siegler és mtsai, 2004; Philo és mtsai, 2004). Az aktív kötőhelyet a MIF és OH-PP szubsztrátjának komplexét röntgenkristallográfias analízissel vizsgálva (Rosengren és mtsai, 1997) a két szomszédos alegység által képzett hidrofób üregben azonosították (Lubetsky és mtsai, 2002).



Lolis. *Current Opinion in Pharmacology* 1, 662–668 (2001)

**1.6.2. ábra A MIF homotrimer molekula, közepén csatorna húzódik. Feketével jelölve a szubsztrátkötő helyek**

A MIF enzimatis aktivitásai közül egyiknek sem ismert fiziológiai (pathofiziológiai) szerepe. Ennek ellenére a MIF enzimaktivitása egy érdekes tulajdonság, mely számos biológiai funkció kulcsa lehet, hisz a MIF tautomeráz/izomeráz zsebével kölcsönhatásba lépő kismolekulák képesek a MIF citokin funkcióját is gátolni (1999; Orita és mtsai, 2002).

Szerkezetileg a legjobb gátlóknak a (E)-2-fluoro-p-hidroxicinnamat (Taylor és mtsai, 1999), a Schiff-bázis triptofán analógok (Dios és mtsai, 2002), az acetaminophen iminoquinon metabolitjai (Senter és mtsai, 2002) és a (S,R)-3-(4-hidroxifenil)-4,5-dihidro-5-izoxazol ecetsav metilészter (ISO-1) (Al-Abed és mtsai, 2005; Cvetkovic és mtsai, 2005) bizonyultak. Ez utóbbi molekula *in vivo* gyulladáshoz vezető biológiai aktivitással is rendelkezik, mert nemcsak a MIF tautomeráz aktivitását gátolja, hanem a PLA<sub>2</sub>-re kifejtett citokin hatást is, továbbá képes megfordítani a glükokortikoid által gátolt TNF felszabadulást (Lubetsky és mtsai, 2002) is. Az ISO-1 *in vivo* javítja az endotoxinnal és a cökum leköttetéssel és punkcióval (CLP) indukált septikus sokk túlélését (Al-Abed és mtsai, 2005). Továbbá hatásosnak találták a streptozotocinnal indukált diabetes mellitus modellben is (Cvetkovic és mtsai, 2005). Azonban az ISO-1 orális alkalmazásáról még nincsenek közlemények. Egyelőre csak egy konferencia kiadványból ismert (W. Ying és J. Sircar) két orálisan aktív MIF gátló kismolekula, melynek szerkezetét még nem fedték fel. Az AVP-13546 és az AVP-13748 *in vitro* gátolja a MIF tautomeráz aktivitását, *in vivo* orálisan adva javítja az endotoxin sokk letalitását is, de éppúgy hatékonyak bizonyultak a kollagén indukált arthritis modellben is. A Cortical Ltd. (E.F.M., P. Tapley, P. Hall, L. di Nezza, T. Gilbert, Y. Yang, B. Danylec és M. Iskander) nem publikált eredményei egy olyan MIF gátló kismolekulát (COR100140) említenek, amely *per os* adva hatásosnak bizonyult az antigén által indukált arthritis ellen.

A MIF katalitikus helyének gátlása közvetlen hatással lehet azon részecskékre, melyek esszenciálisak a MIF-CD74 aktivációhoz, vagy a MIF-ben olyan konformáció változást idézhetnek elő, mely megakadályozza a MIF-CD74 interakciót. Tehát a MIF katalitikus „zsebet” célzó kismolekulák új és szelektív anti-citokin terápiát képviselhetnek. Így a MIF-et gátló kismolekulák az első, orális direkt citokin gátlók lehetnek.

## 1.7 A MIF szerepe a daganatok képződésében

Az elmúlt években sok olyan publikáció látott napvilágot, mely a MIF sejtproliferációban és a tumor angiogenesis szabályozásában betöltött szerepét elemezte (Takahashi és mtsai, 1998; Chesney és mtsai, 1999; Shimizu és mtsai, 1999; del Vecchio és mtsai, 2000; Kleemann és mtsai, 2000; Ogawa és mtsai, 2000; Yang és mtsai, 2000). Az első adat, mely a MIF tumornövekedéssel kapcsolatos szerepére utal egér coloncarcinoma sejtől származik. A carcinomasejt citoplazmájában megemelkedett MIF expressziót találtak, melynek mértéke arányos volt a daganatsejt proliferációjával (Takahashi és mtsai, 1998). Egér coloncarcinoma sejtek mellett megemelkedett MIF expressziót mutattak ki (Takahashi és mtsai, 1998) humán melanoma sejtben (Shimizu és mtsai, 1999), prosztatata adenocarcinoma metasztázisában (Meyer-Siegler és Hudson, 1996), hipofízis adenoma sejtekben (Pyle és mtsai, 2003) és prosztatata rákban (Meyer-Siegler és mtsai, 2005). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a MIF-nek szerepe lehet a tumorok kialakulásában.

Egérben a 38C13 B-sejtes lymphoma MIF antitesttel történt neutralizációját követően drasztikusan visszafejlődött (Chesney és mtsai, 1999). Ez a jelenség azonban csak a tumornövekedés kezdeti szakaszában volt tapasztalható, a MIF ellenes antitest a már kifejlődött tumor növekedését már alig képes befolyásolni. Ennek magyarázata az lehet, hogy a MIF neutralizáció az endothelsejtek növekedésének gátlásához, valamint a tumorkapillárisok számának csökkentéséhez vezet, és nem pedig a lymphocyt proliferációt befolyásolja (Chesney és mtsai, 1999). Az anti-MIF terápia jótékony hatását további, egér és humán sejtvonalon végzett kísérletek is igazolták (Shimizu és mtsai, 1999; Ogawa és mtsai, 2000). Ezekben is a rekombináns MIF sejtproliferációra kifejtett hatását vizsgálták. Egy másik munkában a MIF fokozta a növekedést stimuláló faktorok hatását, de önmagában nem mutatott hatást (Yang és mtsai, 2000). A proliferációt elősegítő tulajdonságot anti-MIF antitesttel meg lehet szüntetni.

Összefoglalva a MIF-nek szerepe van bizonyos tumorok korai növekedésében és az angiogenesisben. Növekedést elősegítő tulajdonsága indirekt, mégis némelyik tumor kialakulásában releváns tényező.



## 1.8 A MIF szerepe egyes kórállapotokban

A MIF számos krónikus és akut gyulladásos kórképben játszik kulcsszerepet. Akut gyulladásos megbetegedés és a megemelkedett MIF vérszintek közötti kapcsolatot először az endotoxin sokkban írtak le. Egereknek intraperitonealisan szeptikus sokkot előidéző dózisu LPS-t injektáltak (Bernhagen és mtsai, 1993). MIF és LPS egyidejű injektálása fokozta az LPS toxicitását, mely megnövekedett letalításban nyilvánult meg. Ezzel szemben, az anti-MIF antitesttel történő neutralizálás megvédte az egereket a letális dózisu LPS-től (Bernhagen és mtsai, 1993). Az a felismerés, hogy a MIF a kísérletesen kiváltott endotoxinaemiában ilyen fontos szerepet tölt be, elvezetett a MIF-knockout egerek (MIF (-/-)) kifejlesztéséhez. A génhiányos egerek a halálos dózisu LPS-sel szemben ellenállóbbak voltak, mint a vad típusú egerek (Bozza és mtsai, 1999).

A MIF fontos szerepet játszik a sepsis lefolyásában is. Nem csak tiszta Gram negatív sepsisben, hanem a kevert formákban is megjelenik. Súlyos sepsisben és septicus sokkban megemelkedett MIF szinteket találtak a betegek vérében (Calandra és mtsai, 2000; Beishuizen és mtsai, 2001; Gando és mtsai, 2001a; Lehmann és mtsai, 2001). A MIF sepsis lefolyásában betöltött szerepének vizsgálatához két állatmodellt használtak, melyekben bakteriális peritonitist indukáltak. Az infekció vagy *Escherichia coli* (*E.coli*) intraperitonealis injekciója által, vagy CLP-vel (cökum lekötés és punkció) történt. Míg az *E.coli* injekció a Gram negatív sepsis modellje, addig a CLP egy kevert multibakteriális sepsis képét adja. Mindkét modellben az infekciót követő rövid időn belül először a peritoneumban, majd szisztémásan is megemelkedett a MIF koncentrációja (Calandra és mtsai, 2000). Az endotoxin sokk modelljéhez hasonlóan (Bernhagen és mtsai, 1993), az *E.coli* infekció kezdetén beadott egyszeri rekombináns MIF dózis is fokozta a mortalitást, míg a MIF neutralizálása antitesttel megvédte az állatokat a letális peritonitistől. A MIF neutralizációja nem gyengíti az immunvédekezést, ami lehetővé teszi a MIF ellenes antitestek későbbi humán alkalmazását. Ezen felismeréshez vezető kísérlet során az egereket az *E.coli* beadás előtt két órával anti-MIF antitesttel kezelték. A kontroll csoporttal összehasonlítva a halálozási ráta nem emelkedett, bár a gyulladásos markerek (TNF, IL-6) plazmaszintje a MIF neutralizáció során csökkent (Calandra és mtsai, 2000). Ez egy lényeges különbség a TNF neutralizációhoz képest, mert az állatok a gyulladásos mediátor anti-TNF antitest dóziséval arányosan immunszupprimáltak és infekciókkal szemben fogékonyabbak

lettek (Echtenacher és mtsai, 1990). A MIF kiemelkedő terápiás szerepét állatkísérletekben az a tény mutatja, hogy TNF deficiens (TNF (-/-)) egereket a MIF ellenes antitest megvédte a letális CLP-től (Calandra és mtsai, 2000). Tehát a MIF neutralizálásával lehetővé válik a sepsis elején jelentkező erős gyulladási reakció csökkentése anélkül, hogy az immunvédekezést gyengítenénk.

A MIF Gram pozitív toxikus sokkban betöltött szerepét is sikerült bizonyítani. Alacsony koncentrációjú TSST-1-vel (toxic shock syndrome toxin 1) és *Streptococcus-exotoxin-A*-val kezelt makrofágok MIF-et szecernálnak (Calandra és mtsai, 1998). Antitesttel történt MIF neutralizálás a galaktózaminnal szenzitizált egereket meg tudta védeni TSST-1 indukált halálos toxikus sokktól (Calandra és mtsai, 1998). Ezen védőmechanizmus alapja, a lymphocyták csökkent aktivációja. A MIF Gram pozitív sokkban betöltött szerepének további bizonyítéka, hogy a galaktóz-szenzitizált, MIF hiányos egerek rezisztensek a *Staphylococcus enterotoxin-B* által kiváltott sokkal szemben (Bozza és mtsai, 1999).

A MIF pulmonáris gyulladási megbetegedésekben is döntő szerepet játszik. Megemelkedett szérumban MIF szinteket találtak krónikus tüdőgyulladásban, illetve ARDS-ben (acute respiratory distress syndrome) szenvedő betegek alveolusában. ARDS-ben a MIF indukálja a proinflammatorikus TNF és IL-6 citokinek felszabadulását, melyek fontos funkciója a gyulladás kialakítása és fenntartása. Anti-MIF antitest szignifikánsan csökkenti ezen citokinek szekrécióját (Donnelly és mtsai, 1997). Asthmás betegek bronchoalveoláris lavage folyadéka is szignifikánsan magasabb MIF értékeket mutat az egészségesekhez viszonyítva (Rossi és mtsai, 1998). Az ARDS-en és az asthmán kívül a MIF szerepet játszik a tuberculosisban és a Wegener granulomatosisban is (Yamada és mtsai, 2002). Ezen adatok azt mutatják, hogy a MIF mind az akut, mind a krónikus gyulladási tüdőbetegségekben is jelen van.

Az eddig említetteken kívül egyéb betegségekben is megemelkedett MIF szinteket találtak: glomerulonephritis (Lan és mtsai, 2000; Matsumoto és Kanmatsuse, 2001), colitis ulcerosa és Crohn betegség (de Jong és mtsai, 2001; Murakami és mtsai, 2001), dermatitis (Shimizu és mtsai, 1997), psoriasis (Steinhoff és mtsai, 1999), szisztémás sclerososis (Selvi és mtsai, 2003), 2. típusú diabetes mellitus (Yabunaka és mtsai, 2000), pancreatitis (Sakai és mtsai, 2003), sclerososis multiplex (Niino és mtsai, 2000), uveitis (Kitaichi és mtsai, 1999), iridocyclitis (Kitaichi és mtsai, 2000), atherosclerosis (Burger-Kentischer és mtsai, 2002), otitis (Kariya és mtsai, 2003), lupus

erythematosus (Foote és mtsai, 2004) és endometriosis (Yang és mtsai, 2000; Kats és mtsai, 2002a).

Azonban a MIF-nek egyes betegségek lefolyásában kedvező szerepe is lehet. Egerekben *Leishmania major*-infekció esetén az exogén MIF védelmet nyújt a megbetegedéssel szemben (Xu és mtsai, 1998). Ugyanezen modellben a MIF makrofágokat is aktivál, melyekből TNF és NO (nitrogén oxid) szabadul fel, melyek megölik a parazitákat (Juttner és mtsai, 1998).

### **1.8.1 A MIF szerepe reumatoid arthritisben**

A reumatoid arthritis (RA) szisztémás, krónikus, sokízületi gyulladással járó megbetegedés. A MIF szerepét RA-ban egereken II-es típusú, kollagén-indukált arthritis (CIA) modellben, patkányokon komplett Freund adjuvánszal (CFA) kiváltott arthritisben vizsgálták (Mikulowska és mtsai, 1997; Leech és mtsai, 1998; Leech és mtsai, 2000; Santos és mtsai, 2001).

A II-es típusú kollagénnel indukált arthritis egérben később kezdődött és a betegség lefolyása enyhébbnek bizonyult, ha az immunizáció előtt anti-MIF antitesttel kezelték az állatot. Ez együtt járt az IgG 2a szintjének csökkenésével (Mikulowska és mtsai, 1997).

CFA-indukált arthritisben a szérum és a synoviális sejtek MIF tartalma megemelkedett, továbbá az ízületi folyadékban található makrofágok is nagy mennyiségű citokint szabadítottak fel (Leech és mtsai, 1998). Az immunizáció napján elkezdett monoklonális anti-MIF kezelés az arthritis súlyosságában dóziszfüggő, szignifikáns csökkenést eredményezett: kisebb mértékű ízületi duzzadás és leukocita infiltráció jött létre, valamint a tünetek később jelentkeztek (Leech és mtsai, 1998). Ebben a modellben az adrenalektómia a klinikai tünetek kiújulását és magasabb mortalitást eredményezett, mely nagy mennyiségű hypophysealis MIF felszabadulással, és megemelkedett szérum szintekkel járt együtt. Ezen állatokat anti-MIF monoklonális antitesttel (mAb) kezelve csökkenthető volt a mortalitás (Leech és mtsai, 2000).

Antigén-indukált arthritis modellben (AIA), a betegség szignifikánsan gátolható volt anti-MIF mAb-val, melyet a synoviális sejtek proliferációjának csökkenése jelzett (Santos és mtsai, 2001). Dexamethason kezelés szintén gátolta a betegség kialakulását, de ha MIF-et is adtak a dexamethason mellé az állatnak, hatás fordított lett, azaz az AIA súlyossága messze meghaladta még a kontrollokt is. Melynek magyarázata a MIF glükokortikoid hatást ellenreguláló működése lehet (Santos és mtsai, 2001).

MIF hiányos egerekben végzett kísérletek is megerősítették a MIF RA-ban betöltött szerepét. Kollagén-indukált arthritis nem alakult ki MIF (-/-) egerekben (Ichiyama és mtsai, 2004). Az antigén indukált arthritis szövettanilag kevésbé súlyos képet mutatott, valamint a porcpusztulás mértéke is enyhébb volt (Leech és mtsai, 2003). Ez utóbbi tanulmányban azt is kimutatták, hogy MIF hiányában csökkent a synoviális sejtek proliferációja, fokozódott az apoptózisuk és növekedett bennük a p53 expressziója. Ez azért fontos, mert a synoviocyta felszaporodása és a porchoz, csontoz történő inváziója bizonyítottan hozzájárul a porckárosodáshoz. További MIF hiányos egérikísérletek alapján a MIF felelős a károsodott ízületben a gyulladáshoz vezető sejtek akumulációjáért is, mert részt vesz az endotoxin, illetve TNF stimulus hatására történő fehérvérsejt toborzásban, proliferációban és túlélésben (Gregory és mtsai, 2004).

Az állatkísérletekkel összhangban RA-ban szenvedő betegek synoviális folyadékában 5-10-szer magasabb MIF koncentrációt találtak, mint egészséges egyéneknél (Leech és mtsai, 1999; Onodera és mtsai, 1999). Ugyanakkor a szérumban is oly mértékben megemelkedett MIF szinteket lehet kimutatni, mely már elégséges volt a fehérvérsejt *in vitro* aktiválásához (Leech és mtsai, 1999). Humán RA-s ízületi folyadékban a MIF gyakorlatilag az összes RA pathogenezisében részt vevő sejtben megtalálható, úgy, mint a makrofágokban, az endothel sejtekben és a fibroblaszt-szerű synoviocytaiban, de kisebb mennyiségben a CD3-pozitív synoviális lymphoid aggregátumokban is (Leech és mtsai, 1999; Onodera és mtsai, 1999). 2002-ben leírták, hogy az ízület MIF tartalma és a RA aktivitása között is kapcsolat van, ez utóbbi paramétert a szérum C-reaktív protein (CRP) koncentráció mérésével határozták meg. Az aktív RA-s betegek ízületének kezelés előtt magasabb volt a MIF tartalma, mint kezelést követően (Morand és mtsai, 2002).

RA-s betegekben a MIF-nek szerepe van a synoviocyta aktivációjában és a foszfolipáz A2 (PLA<sub>2</sub>), a ciklooxygenáz 2 (COX2) (Sampey és mtsai, 2001), az IL-6, IL-8 (Onodera és mtsai, 2004; Santos és mtsai, 2004) és a mátrix metalloproteináz-MMP1, MMP3 (Onodera és mtsai, 2000) fokozott expressziójában. Az MMP1 és 3 az extracelluláris mátrixalkotórészek degradálásában fontos. A MIF neutralizálásával az MMP *de novo* szintézisét megakadályozhatjuk, ezzel a káros lebontó folyamatokat lassíthatjuk. Onodera és munkatársai patkány osteoclastokban a MIF MMP9 és MMP13 indukcióját is igazolták, mely felelőssé tehető az RA-ban fellépő csontdestrukció és osteoporosis kialakulásáért (Onodera és mtsai, 2002). A MIF makrofágokban a p53 expressziót és az apoptózist gátolva elősegíti a sejt túlélését (Mitchell és mtsai, 2002),

valamint hozzájárul a humán synoviocyták proliferációjához, gátolja a p53 expresszióját, ezáltal a synoviocyták apoptózisát (Lacey és mtsai, 2003; Leech és mtsai, 2003).

### **1.8.2 A MIF szerepe endometriosisban**

Endometriosisban ektópiás endometrium szövet perzisztál a méhürön kívül. A peritoneals folyadékban számos immun-és gyulladáshoz köthető mediátor szintje megemelkedik. Yang és munkacsoportja kimutatta, hogy a MIF endometriális sejtekből is származhat, és elősegíti az endothel sejtek növekedését (Yang és mtsai, 2000), ebből arra következtettek, hogy a MIF felelős lehet az endometrioma fokozott angiogeneziséért.

Endometriosisos nők peritonealis mosófolyadékában fokozott MIF immunreaktivitást találtak, mely különösen az aktív betegség első két stádiumára volt jellemző (Kats és mtsai, 2002a). Endometriosisos nők peritonealis és keringő MIF koncentrációja szignifikánsabban magasabb volt a meddőséggel és fájdalommal is járó esetekben (Kats és mtsai, 2002b; Morin és mtsai, 2005). Más tanulmányokban nem találtak összefüggést a hasmosófolyadék MIF tartalma és a betegség stádiuma, illetve az invázió mélysége között, bár a MIF értékek a nem endometriosisos populációhoz képest szignifikánsan magasabbak voltak (Mahutte és mtsai, 2004).

Endometriosisos hasmosófolyadékból izolált makrofágok több monocyta chemotaktikus protein-1-et (MCP-1) és MIF-et szekretálnak, melyek szekréciója LPS stimulus hatására fokozódott, az egészséges kontrollokéhoz viszonyítva (Akoum és mtsai, 2002a). Endometriosisos betegek emelkedett MIF szintjét immunhisztokémiával is vizsgálták, és a MIF ciklusfüggését tapasztalták (Akoum és mtsai, 2002b). Aktív stádiumban az endometrium sejtek több MIF mRNS-t expresszálnak (Kats és mtsai, 2002b). Endometriális stróma sejtekben a humán choriális gonadotropin (hCG) az ovariális granulóza sejtek MIF szekréciójához hasonlóan (Wada és mtsai, 1999) indukálja a MIF expresszióját és szekrécióját (Akoum és mtsai, 2005),

Humán endometriumban megfigyelték, hogy a MIF expressziója a menstruációs ciklus késői proliferatív /korai szekretoros fázisában megemelkedik, az érzékeny fázisban (azaz az úgynevezett implantációs ablakban) pedig mérséklődik, majd a ciklus végére ismét fokozódik (Kats és mtsai, 2005). A MIF expresszió ezen ciklusfüggése szigorú szabályozást feltételez, és előre vetíti a MIF különböző szerepét az endometriumban a ciklusok alatti reparatív, reprodukív és gyulladáshoz köthető folyamatokban.

Immunoreaktív MIF-et főleg a mirigyekben és a felszíni epitheliumban találtak (Kats és mtsai, 2005).

Endometriosisban szenvedő nők peritonealis makrofágjai nagy mennyiségű interleukin-1-bétát (IL1 $\beta$ ) termelnek, mely megjelenik a peritonealis folyadékban is. Ez a nagy mennyiségű IL1 $\beta$  fokozza az endometriális stróma sejtek MIF szintézisét és szekrécióját. A MIF fehérje expresszióját és az mRNS szintézisét az IL1 $\beta$  dózis (0,1-100 ng/ml) és időfüggő módon biztosítja. A kappa B nukleáris transzkripció faktor (NF $\kappa$ B) aktiváció ismert gátlója a kurkumin 10<sup>-8</sup> M koncentrációban képes gátolni az IL1 $\beta$  indukált MIF szekrécióját, az NF $\kappa$ B nukleáris transzlokációját és a DNS kötést. Tehát az endometriális stróma sejtekben a IL1 $\beta$  hatására bekövetkező fokozott MIF gén transzkripció - MIF expresszió - valószínűleg az NF $\kappa$ B közvetítésével valósul meg (Cao és mtsai, 2005).

Endometriosisos nők endometrium szövetében vizsgálták a MIF expresszióját és összehasonlították egészséges, fertilis nőkével. A MIF intrauterin expressziója endometriosisban szignifikánsan magasabb volt, mely a betegség stádiumával növekszik, de függ a ciklustól is. A kontrollhoz viszonyítva a MIF szint a szekretoros fázis közepén és a menstruációt megelőző késői szekretoros fázisban fokozódik, mely az infertilis nők mintáiban még kifejezettebb. Különösen magas MIF szinteket mértek azon endometriosisos nőkben, akik infertilisek is voltak és alhasi fájdalomról is panaszkodtak (Akoum és mtsai, 2006). Tehát a MIF-nek szerepe lehet a fájdalommal és terméketlenséggel járó endometriosisban.

## **1.9 A MIF szerepe az anyagcserében**

Ismert, hogy az egerek zsírsejtjei MIF-et expresszálnak (Hirokawa és mtsai, 1997), és nemrégiben kimutatták azt is, hogy az emberi zsírsejtek is lehetnek MIF források (Skurk és mtsai, 2005). Ghanim és mtsai (2004) elhízott emberek perifériás vérében kimutatták, hogy a mononukleáris sejtekben megemelkedik a MIF mRNS, mely emelkedett plazma MIF koncentrációkat eredményezett. Ezt a megemelkedett MIF szintet elhízott betegekben metformin antidiabetikummal csökkenteni tudták (Dandona és mtsai, 2004). Nemrégiben kimutatták azt is, hogy nemcsak elhízott emberekben, hanem 2-es típusú diabeteses betegekben is megemelkedik a szérum MIF szintje (Yabunaka és mtsai, 2002).

A MIF a hasnyálmirigy inzulintermelő  $\beta$ -sejtjeiben is előfordul (Waeber és mtsai, 1997). A szekretoros granulumokban az inzulinnal együtt található. Glükóz stimulus hatására fokozódik a pancreas  $\beta$ -sejtjeiből a MIF felszabadulása, ami emeli a  $\beta$ -sejtek inzulin termelését (Waeber és mtsai, 1997). Ugyanakkor az is ismert, hogy az inzulin képes szabályozni a MIF expresszióját, és ez összefüggésben lehet az inzulinrezisztenciával (Sakaue és mtsai, 1999; Benigni és mtsai, 2000; Vozarova és mtsai, 2002), jelenleg még sincs elég adat a 2-es típusú diabetes és a MIF kapcsolatáról (Yabunaka és mtsai, 2002).

Károsodott glükóz-toleranciában (Impaired Glucose Tolerance: IGT) és 2-es típusú diabetesben szenvedő betegekben szignifikánsan megemelkedett a szérumban a MIF szintje (Herder és mtsai, 2006), mely arra utal, hogy a szisztémás MIF koncentráció emelkedése tükrözi a normoglycaemiától az IGT-ig, majd a 2-es típusú cukorbetegségig terjedő lépcsőket.

## 2 Anyagok

### 2.1 Eszközök, műszerek

DELFLIA plate shaker	Wallac-OY, Turku, Finland
DELFLIA plate washer	Wallac-OY, Turku, Finland
DELFLIA Victor 1420 multilabel counter	Wallac-OY, Turku, Finland
Dynamic plantar aesthesiometer 37400	Ugo Basile, Comerio, Italy
Dynamic plantar plethysmometer 7140	Ugo Basile, Comerio, Italy
Elektronmikroszkóp: JEOL 1200 EX-II	Jeol (Europe) S.A. Croissy-Sur-Seine, France
ELISA Reader: Dynatech MR7000	Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, VA, USA
Fénymikroszkóp: Olympus CX-50	Olympus, Tokyo, Japan
Fotométer (Bradfordhoz): Spectronic 21D	Milton Roy Co., Rochester, NY, USA
Fotométer (enzimreakcióhoz): Hitachi U-3010	Hitachi Ltd., Tokyo, Japan
Fotométer (polimerizációhoz): Shimadzu UV -2100	Shimadzu, Kyoto, Japan
Gélelektroforézis felszerelések	Bio-Rad, USA
Hyperfilm ECL (RPN 2106V1 & V2)	Amersham, Life Science Ltd, UK
Késes homogenizátor: Ultraturrax T25	KIKA Labortechnik, Staufen, Germany
Kodak Image Station (IS440CF) (WB-hoz)	Kodak, USA Kodak IS440CF Image Station
Quartz küvetta: Q-104	Yixing Economically Coordinated Ltd, Yixing, China
Ultracentrifuga: Sorvall Ultra80	Thermo Kendro, Asheville, USA

### 2.2 Antitestek, enzim, molekula standard, ELISA kitek

NÉV	Hígítás	Katalógus szám	Forgalmazó
Goat anti-rabbit-IgG-HRP konjugált	1:2.000	P0448	DAKO, Glostrup, Denmark
Rabbit anti-rat MIF	1:2.000	TP234	Torrey Pines Biolabs, Houston, TX, USA
Rabbit anti-rat MIF IgG	1:20.000	36-7401	Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA
Rabbit anti- $\alpha$ Tubulin H-300	1:200	sc-5546	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA
Tautomerase (bovine kidney)	1:4	T-6004	Sigma-Aldrich Co., Budapest, Hungary



Color Marker Rainbow	1:10	C-3437	Sigma Budapest, Hungary
ELISA: huMIF DUO SET Dev. System		DY289	R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA
ELISA: IL-1 $\beta$ BD OptEIA		559111	BD, Biosciences, San Jose, CA, USA

### 2.3 Pufferek, oldatok

13%-os Szeparáló gél (SDS-PAGE-hez)	12.87 ml 30%-os (m/v) akrilamid 7.5 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 9 ml dH <sub>2</sub> O 300 $\mu$ l 10%-os (m/v) SDS 300 $\mu$ l 10% (m/v) ammónium perszulfát 15 $\mu$ l TEMED
Beeresztő gél (SDS-PAGE-hez)	1.24 ml 30 % (m/v) akrilamid 0.94 ml 1M Tris-HCl (pH 6.8) 5.1 ml dH <sub>2</sub> O 75 $\mu$ l 10%-os (m/v) SDS 75 $\mu$ l 10%-os (m/v) ammónium perszulfát 3 $\mu$ l TEMED 100 $\mu$ l 10 % (m/v) SDS
Futtató puffer (SDS-PAGE-hez)	3 g/L Tris 14.4 g/L glycin 10 ml/L SDS 10 % pH 8.3
SDS 2x minta puffer (SDS-PAGE-hez)	1 ml 1M Tris-HCl (pH 6.8) 2 ml glicerol 4 ml 10%-os (m/v) SDS 0.6 ml $\beta$ -merkaptotanol 0.5 ml 0.05% brómfenolkék 1.9 ml d H <sub>2</sub> O
4M UREA (WB-hoz)	120g UREA 1.46g NaCl 3.2g EDTA pH: 7.0
Blokk puffer (WB-hoz)	20% NEH 5x 0.05% Triton-X 100 0.25% gelatin 3% BSA pH: 7.4

Hígító puffer (WB-hoz)	20% NEH 5x 0.05% Triton-X 100 0.25% gelatin 1% BSA pH: 7.4
Mosó puffer (WB-hoz)	20% NEH 5x 0.05% Triton-X 100 0.25% gelatin pH: 7.4
NEH 5x törzs (WB-hoz)	50 mM HEPES 5 mM EDTA 150 ml NaCl
Transzfer puffer 1x (WB-hoz) 1000 ml	50 ml Transzfer puffer 20x törzs 5 ml 10% SDS törzs 200ml Methanol
Transzfer puffer 20x törzs (WB-hoz) 400 ml	8.54 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O 17.47g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O pH: 6.8
Ekvibráló oldat (ezüstözéshez)	1.9 g/l ezüstnitrát tartalmú vizes oldat
Fixáló oldat (ezüstözéshez)	50 % etilalkohol 10 % ecetsav
Mosó oldat I (ezüstözéshez)	25 % etilalkohol 10 % ecetsav
Mosó oldat II (ezüstözéshez)	10 % etilalkohol 0.5 % ecetsav
Redukáló oldat (ezüstözéshez)	30 g/l NaOH tartalmú oldatban közvetlenül a használat előtt 7.5 ml/l formaldehidet oldunk (37 %-os), ill. 80 mg/l Na-borohidridet
Színstabilizáló oldat (ezüstözéshez)	7.5 g/l nátriumkarbonát
Mosópuffer	50 mM HEPES 5 mM EDTA 150 mM NaCl 0.05% Triton-x 100 0.25% gelatin pH 7.4

200 mM Na-Phosphate Reakció puffer (Enolázhoz)	58 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 142 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6.2
50mM Na-Phosphate Reakció puffer (Ketonázhoz)	50 mM Na-Phosphate pH 6.5
Bórsav oldat (Enolázhoz)	0.9 M Bór sav pH 6.2
Szubsztrát puffer (Enolázhoz)	50 mM Na-Acetate pH 6.0
Szubsztrát-Törzsoldat (Enolázhoz)	100 mM Na-Fenilpiruvát Szubsztrát pufferben
Szubsztrát-Törzsoldat (Ketonázhoz)	50 mM Fenilpiruvát Ethanolban
PBS	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 8.1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH: 7.2-7.4 0.2µm filteren átszűrni
Acetát puffer (TR-FIA, DELFIA-hoz)	0.1 M Na-acetát pH 5.0
Assay puffer (TR-FIA, DELFIA-hoz)	5 g BSA/l Tris-HCl puffer pH 7.8
Block Puffer (ELISA-hoz)	1% BSA 5% Sucrose 0.05% Na-azid PBS-ben
Hígító Reagens (ELISA-hoz)	1% BSA PBS-ben pH 7.2-7.4 0.2µm filteren átszűrni
Mosó Puffer (ELISA-hoz)	0.05% Tween-20 PBS-ben pH : 7.2-7.4
Stop oldat (ELISA-hoz)	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

Szubsztrát oldat (ELISA-hoz)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> („A” reagens) tetramethylbenzidine („B” reagens) 1:1 arányú keveréke
Homogenizációs puffer (Tubulin izoláláshoz)	50 mM MES 1 mM EGTA pH 6.9
DAB oldat (immunhisztokémiához)	0.004% 3,3'-diaminobenzidin (DAB) 0.004% 3%-os H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> TRIS pH 7.4
Brinkley BR puffer 1980 (BRB80) (HM tubulin izoláláshoz)	80 mM K-PIPES 1 mM MgCl 1 mM EGTA pH 6.8 (KOH-val)
Depolimerizációs puffer (DP) (HM tubulin izoláláshoz)	50 mM MES 1 mM CaCl <sub>2</sub> pH 6.6 (KOH-val)
High-molarity PIPES puffer (HM tubulin izoláláshoz)	1 M PIPES 10 mM MgCl 20 mM EGTA pH 6.9 (KOH-val) 1:1 arányban adni a DP-hez

## 3 Módszerek

### 3.1 Fehérje módszerek, tisztítások

#### 3.1.1 Fehérje meghatározás Bradford fotometriás módszerrel

A minták fehérjetartalmát Bradford módszerrel határoztuk meg (Bradford, 1976), melyben a standard hígítási sor (1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml) felvételéhez BSA foszfát pufferes oldatait használtuk. Pl. a tubulin fehérjetartalmát 2x, 50x-es hígítási faktort alkalmazva mértük. A standard és a mintahígítás 50-50 µl-éhez 950 µl Bradford reagenst adtunk, majd 4 perces várakozás után 595 nm-en detektáltuk az extinkció változását. A kapott értékekből Microsoft Excel program segítségével, interpolálással határoztuk meg a minták fehérjetartalmát.

#### 3.1.2 SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

Az SDS poliakrilamid gélelektroforézist Laemmli szerint készítettük (Laemmli, 1970), BioRad eszközök felhasználásával. Denaturálást 100°C-on 3 percig végeztük, a mintapuffert 1:1 v/v arányban adtuk a mintához és a molekula markerhez. A denaturált mintából lyukanként 20 µl-t használtunk fel. A beeresztő gélben összesen 80 mA áramerősséget használtunk, majd, amikor a minták elérték a beeresztő és futtatógél határát, az áramerősséget gélenként 75 mA-re változtattuk.

#### 3.1.3 Western Blot

A géleken elválasztott fehérjéket 150mA állandó áramerősséggel egy éjszakán át transzferáltuk nitrocellulóz membránra 4°C-on (ú.n. blottolás). A 3%-os BSA oldattal történt (2 óra, 20°C) blokkolást követően 3 óráig, 4M ureában ázott a membrán, majd 3x5 perc mosás után egy éjszakára, 4°C-on primer antitesttel (rabbit anti-rMIF (1:2.000), majd 4 órán át szobahőmérsékleten torna-peroxidázzal (HRP) jelölt szekunder antitesttel inkubáltuk. ECL (*enhanced chemiluminescence*) reagens hozzáadását követően Kodak IS440CF Image Station készülékkel detektáltuk a kibocsátott fényt. A „band”-ek intenzitását denzitometriával határoztuk meg

### 3.1.4 Ezüstözés

Elektroforézis után az óvatosan eltávolított géleket műanyag dobozban legalább 2 óráig fixáltuk, majd cseréltük rajta a fixálót és legalább 2 óra hosszat, de gyakrabban egy éjszakán át tovább fixáltuk. A gélt a mosó I oldattal, kétszeri váltással egy órán át, majd a mosó II oldattal szintén kétszeri váltással, ismét egy óráig mostuk. A gélt lassú rázás közben 2 óráig az equilibráló oldatban inkubáltuk, majd ioncserélt vízzel, a felületre tapadt ezüstöt rövid (10-20 s) mosással eltávolítottuk.

### 3.1.5 Tubulin izolálás

Emlős sejtekben a mikrotubulusok 10°C alatti hőmérsékleten depolimerizálnak (szétesnek), míg megfelelő koncentrációjú GTP és magnéziumion jelenlétében, 35-37°C-on *in vitro* újra felépülnek (polimerizálnak). A hideg-indukálta mikrotubulus depolimerizációra alapozva, úgynevezett hőmérsékletfüggő polimerizációs/depolimerizációs ciklus révén relatíve könnyen tisztíthatók. Ezt a tubulin tisztítási módszert agyszövetből, először Shelanski és munkatársai, 1973-ban írták le.

Kísérleteinkben sertésagyból, Shelanski módszerével izolált tubulin preparátumot használtunk. A sertésagyakat közeli vágóhídról közvetlenül az állat leölése után jégfürdőn szállítottuk a laborba. Az agyhártyák eltávolítása után lemértük a sertésagy súlyát, majd 1 ml/400 mg homogenizációs pufferrel kiegészítve késes homogenizálást végeztünk jégfürdőn. Ultracentrifugálás (15000 RPM, 30 perc, 0°C) után a citoszól frakcióval dolgoztunk tovább. Ezt követően újabb ultracentrifugálást hajtottunk végre (25000 RPM, 40 perc, 0°C), majd 30 percig 37°C-os vízfürdőn polimerizáltuk a tubulint 0,6 mM GTP, 1 mM MgCl<sub>2</sub> és 0,52 ml glicerin/ml hozzáadásával. A polimerizált tubulint centrifugálással (25000 RPM, 30 perc, 25°C) különítettük el a frakció többi részétől. A pelletet késes homogenizátorral jégfürdőn. (2×1 sec) homogenizáltuk, és a depolimerizáció létrejötte érdekében 30 percig 0°C-os jégfürdőn tartottuk, időnként megforgattuk. A preparátumot a mérésekig 4°C-on tároltuk, de 24-48 órán belül felhasználtuk. Mivel csak 1 polimerizációs-depolimerizációs ciklust hajtottunk végre az így nyert tubulin preparátum mikrotubulushoz asszociált protein (MAP) tartalma nagy volt.

### 3.1.6 HM- tubulin tisztítási módszer

A frissen eltávolított agyat DP pufferben (depolimerizáló puffer), jégen szállítottuk a laborba, majd az agyról csipesszel eltávolítottuk a lágy agyhártyát és az ereket. Ismét átmostuk DP pufferben, majd súlymérést követően grammonként 1 ml hideg DP pufferrel felöntöttük, és késes homogenizátorral 2x 30s-ig homogenizáltuk. A homogenizátumot centrifugacsövekbe mértük és 4°C-on, 60 percig, 29.000g-vel centrifugáltuk. A felülúszót lemértük és kiegészítettük a polimerizációhoz: 1/3: felülúszó, 1/3: 37°C-os HM-PIPES puffer, 0,5 mM GTP, 1,5 mM ATP, 1/3 rész 37°C-os glicerin. A kiegészített mintát 37 °C-os vízfürdőn 60 percig inkubáltuk, majd lecentrifugáltuk (160.000g, 37°C, 30 percig). A felülúszót leöntöttük, a centrifugacső alján található zselét (tubulin) 20 ml DP pufferrel felszuszpendáltuk. Ezt követte a tubulin depolimerizációja: 0°C-on, min. 1 órán át időnként megkevergetve.

A depolimerizált tubulint lecentrifugáltuk (70.000g 4°C, 30 percig), majd a felülúszót az előzőknek megfelelően ismét kiegészítettük, és újra 37°C-os vízfürdőn 30 percig inkubáltuk. A polimerizált tubulint lecentrifugáltuk (160.000g 37°C, 30 percig), majd az így kapott zselét 15 ml jéghideg BRB80 pufferben reszuszpendáltuk. A depolimerizáció ismét jégen történt, végül a depolimerizált tubulint utolsó centrifugálásnak vetettük alá (100.000g, 4°C, 30 percig). A felülúszót hirtelen, folyékony nitrogénben 100-200 µl mennyiségként fagyasztottuk le. A tubulin koncentrációját  $A_{280}$  abszorbanancián mértük. (extinkciós koefficiens =115000) (Castoldi és Popov, 2003).

### 3.1.7 Ízületi homogenizátum készítése

IL1 $\beta$  ELISA mérés céljára az egerek tibiotarsalis ízületeit kimetszettük. Súlymérést követően 1ml/10mg pufferbe (RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Csertex, Hungary) és PMSF 1:100 keveréke) helyeztük, majd jégen 3 perc alatt ollóval apróra daraboltuk. Ezt követően, szintén jégen 3 percig késes homogenizátorral (KIKA Labortechnik) 20.500 fordulat/perc sebességgel homogenizálást végeztünk. A kapott homogenizátumot 4 °C-on 10 percig 10.000 rpm fordulaton centrifugáltuk, és az így kapott felülúszót használtuk az ELISA vizsgálatokhoz.

## 3.2 Kémiai vegyületek előállítása

Ezen módszerek megtervezése és kivitelezése a PTE AOK Orvosi Kémiai Intézetében Lóránd Tamás dr. nevéhez fűződik. A *E*-2-arilidén-cikloalkanonok (**1-28**) szintézisénel a megfelelő cikloalkanonból nagy felesleget kellett alkalmazni a kétszeres kondenzáció elkerülése érdekében. A reakciók a ciklopentanon-származékoknál szobahőmérsékleten történtek, míg a ciklohexanon-származékoknál valamint az aciklusos ketonoknál (**51-53**) 3 órás forralás mellett, NaOH katalizátor jelenlétében. Az *E*-2-benzilidén-1-indanon (**30**), az *E*-2- benzilidén-1-tetralonok (**31, 33-50**), és a *E*-2-benzilidén-1-benzoszuberon (**32**) szintézise szobahőmérsékleten, etanolos oldatban, NaOH jelenlétében zajlott.

A vegyületek szerkezetének igazolása FT IR és NMR spektroszkópiai módszerekkel történt.

## 3.3 Immunológiai módszerek

### 3.3.1 ELISA módszer (MIF ELISA)

#### I. Plate előkészítés:

A 96 lyukú lemez minden lyukát 100 µl capture antitesttel bevontuk és a plate-et lezárva egy éjszakán keresztül 20°C-on inkubáltuk. Másnap minden lyukat kiszívtunk és 400 µl mosó pufferrel 3x átmostuk. A plate-ek blokkolásához 300 µl Block pufferrel töltöttük fel a lyukakat, majd 1 órán át szobahőn inkubáltuk. Ismételt mosást követően hozzáadtuk a mintát.

#### II. Streptavidin-HRP Assay:

Lyukanként 100 µl tömény mintát, vagy annak 5x, 10x-es hígítását illetve a standardot bemértünk, majd parafilmmel beborítva 2 órán át, szobahőn inkubáltuk, a vakba 100 µl mosó puffer került. Az inkubációt követően kiszívtuk a folyadékot a lyukakból, majd mosás után 100 µl Detektáló antitestet pipettáztunk minden lyukba. Parafilmmel beborítva 2 órán át, 20°C-on inkubáltuk, melyet ismét mosás követett. 100 µl Streptavidin-HRP-t hozzáadva, maximum 20 percen át inkubáltuk szobahőn. Mosás után a szubsztráttal (100 µl) ismét 20 perces inkubáció következett. A reakciót végül 50 µl Stop oldattal



leállítva, 450 nm-en azonnal megmértük az egyes lyukak optikai denzitását (háttér: 570 nm).

Az IL-1 $\beta$  ELISA-t szintén 450 nm-en mértük, de 620 nm háttér korrekciót alkalmaztunk.

### 3.3.2 TR-FIA, DELFIA módszer

Ezen módszerrel prof. Hermann Adlercreutz laboratóriumában vizsgáltam a szérumok fitoösztrogén tartalmát (Folkhälsan Research Center; Institute for Preventive Medicine, Nutrition, and Cancer; Department of Clinical Chemistry; University of Helsinki; Finland).

200 $\mu$ l plazmát 200  $\mu$ L  $\beta$ -glucuronidázzal és szulfatázzal összekevertünk, és acetát pufferben 37°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Hidrolízist követően a nemkonjugált enterolaktont dietil-éterrel extraháltuk. A hidrolizált extraktumot assay pufferben kecskében termeltetett nyúl ellenes IgG-vel előkezelt mikrolemezre pipettáztuk. Majd hozzáadtuk az antiszérumot (marha szérum albumin és Tris puffer 1:250.000 hígításában), és az európium jelölt enterolaktont 1:400.000 hígításban. Szobahőn történő 90 perces óvatos rázással (DELFIA plate shaker (Wallac)) történt inkubálás után a lemezt kimostuk (DELFIA plate washer (Wallac)).

Ezt követően minden lyukhoz hozzáadtuk a DELFIA felerősítő (enhancer) oldatot (Wallac), majd további 5 perc óvatos rázás után leolvastuk a fluoreszcencia mértékét (DELFIA Victor multilabel counter (Wallac)). A szérum mintákból minden esetben három, a kontrollokból két párhuzamos mérést végeztünk.

Az eredmények értékelése:

Plasma ENL = leolvasott koncentráció  $\times$  1/recovery  $\times$  hígítási faktor.

## 3.4 Bioaktivitás tesztek

### 3.4.1 Fenilpiruvát tautomeráz aktivitás

Méréseinket a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében, valamint a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben végeztük.

MIF-ként a Sigma cég által gyártott marha veséből izolált fenilpiruvát tautomerázt használtunk. Ezen enzim Western blot analízisén egér anti-MIF antitesttel a rekombináns humán MIF-fel együtt migráló 12,4 kD sáv festődik, valamint ugyanolyan

fenilpiruvát tautomeráz aktivitással rendelkezik mindkét enzim (Rosengren és mtsai, 1997). A marha veséből izolált fenilpiruvát tautomeráz és a rekombináns humán MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitását hasonló módon befolyásolja mind a luteolin, mind a quercetin (Garai és Adlercreutz, 2004).

Az enzimreakció gátlóit minden esetben frissen hígítottuk, és adtuk a rendszerhez 1, 5, 20, 50, 100, 200 illetve 400  $\mu\text{M}$  végkoncentrációban.

A vizsgált kismolekulák többségét a Sigmától rendeltük, a rozmaringsavat az ICN-től.

#### **3.4.1.1 Ketonáz reakció**

A fenilpiruvát tautomeráz aktivitás ketonáz reakcióját  $20^{\circ}\text{C}$ -on, 288 nm-en, kétutas Shimadzu 2100 UV spektrofotométerrel, 75 másodpercig követtük. A 720  $\mu\text{l}$  reakcióelegy 50 mM pH 6,5 Na-foszfát reakciópuffert, 0,4  $\mu\text{g/ml}$  végkoncentrációjú tautomeráz enzimet és szubsztrátként 100  $\mu\text{M}$  fenilpiruvátot tartalmazott.

#### **3.4.1.2 Enoláz reakció**

Az enoláz reakciót  $20^{\circ}\text{C}$ -on, 300 nm-en, kétutas Shimadzu 2100 UV spektrofotométerrel 900 másodpercig követtük. A 720  $\mu\text{l}$  reakcióelegy összeállításához 200 mM pH 6,2 Na-foszfát reakciópuffert, 0,9 M pH 6,2 bórsav-oldatot, 0,4  $\mu\text{g/ml}$  végkoncentrációjú enzimet, és szubsztrátként 200  $\mu\text{M}$  koncentrációjú Na-fenilpiruvátot használtunk.

#### **3.4.2 Tubulin polimerizáció**

A tubulin polimerizációt 350 nm-en, az áteső UV fény diffrakciójával követtük kétutas Shimadzu 2100 UV spektrofotométerrel  $33^{\circ}\text{C}$ -on, a PTE ÁOK Biofizika Intézetében. A mérendő küvettába 1mg/ml tubulin, a vakban 50mM MES és 1mM EGTA-ból készült (pH 6,9) reakciópuffert tettünk. Mindkét küvetta tartalmazott továbbá 1 M  $\text{MgCl}_2$ -t és 30 mg/ml koncentrációjú GTP-t. A méréseket a plató szakasz eléréséig folytattuk.

## **3.5 Immunhisztokémia**

### **3.5.1 Fénymikroszkópos immunhisztokémia paraffinba ágyazott metszeteken**

A 10 µm vastag metszetek deparaffinálása és dehidrálása után, a metszeteket 3x 10 percig TRIS pufferben (pH 7,6) mostuk, majd 3x5 perces mikrohullámú kezelést követően az endogén peroxidáz aktivitás gátlására 30 percig 1%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ban inkubáltuk. Ezt követően a felesleges hidrogénperoxidot TRIS pufferrel 4-5x 10 percig tartó mosással eltávolítottuk. A metszeteket TRIS-ben hígított 1% normál ló szérummal (Vectastain ABC Elite Kit PK-6200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 1 órán át inkubáltuk. A metszeteket a primer antitesttel szintén 1%-os normál ló szérumot tartalmazó TRIS pufferben 1 éjszakán át nedves kamrában inkubáltuk. A következő primer antitesteket használtuk: nyúlban termeltetett anti-MIF antitest (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) 1:5.000 illetve 1:10.000 hígításban, illetve nyúlban termeltetett anti-αTubulin, (Santa Cruz Biotechnology, BioMed GmbH, Heidelberg, Németország) 1:200x hígításban. A szekunder antitest előtt ismét 3x10 perces mosás következett, majd a szekunder antitesttel (biotinilált anti-nyúl IgG) 1:100 hígításban 4 órán át reagáltattuk. Ezt követte 3x 10 perces mosás után az avidin-biotin-peroxidáz komplexszel szobahőn, 2 órán keresztül történő inkubáció, melyet ismét 3x10 perces mosás követett. Az immunreakciót 0,004% koncentrációjú 3,3'-diaminobenzidinnel 0,004%-os hidrogénperoxid jelenlétében tettük láthatóvá. A reakciót fénymikroszkóp alatt kontrolláltuk. Ismételt mosást követően, a metszeteket felszálló alkoholsorban dehidráltuk, xilolban derítettük és DePeXszel (Fluka, Buchs, Svájc) lefedtük.

A primer antitesttel párhuzamosan negatív kontrollt is készítettünk, ahol vagy a primer, vagy a szekunder antitestet elhagytuk.

### **3.5.2 Fénymikroszkópos immunhisztokémia úsztatott metszeteken**

A 60 µm vastag, vibratómmal készített metszeteket 3x10 perces TRIS-sel (pH 7,6) történő mosást követően az endogén peroxidáz gátlását 30 percig 1% hidrogénperoxidot tartalmazó oldatban végeztük. Ismételt 3x10 perces mosás után TRIS-ben hígított 1 % normál lószérumot és 0,4% Triton X-100-at tartalmazó oldatban 1 óráig inkubáltuk. Ezt követte a primer, majd a szekunder antitesttel, végül az ABC-vel (avidin biotin peroxidáz komplex) történő inkubáció. Az immunreakció láthatóvá tételét a paraffinos metszetek immunhisztokémiájánál leírt módon végeztünk. A megfestett

metszeteket zselatinózott tárgylemezre húztuk fel, majd ezt követően emelkedő koncentrációjú alkoholsorban dehidráltuk, xilolban derítettük, és DEPEX-szel fedtük.

### **3.5.3 Elektronmikroszkópos immunhisztokémia**

Az elektronmikroszkópos vizsgálathoz a hippocampust és a hozzá csatlakozó parahippocampalis kérget és a temporális neocortexet tartalmazó blokkot 3 órán át, szobahőn 0,1% glutáraldehidet is tartalmazó 4%-os pufferelt formaldehidben fixáltuk. A 60  $\mu\text{m}$  vastag vibratómmal készített metszeteket cryoprotectio céljából 15%-os szacharóz oldatba tettük, majd mikor lesüllyedt, egy éjszakán át 30%-os szacharóz oldatban tartottuk. Ezt követően az antitestek penetrációjának elősegítése érdekében, a metszeteket háromszor folyékony nitrogénben átfagyasztottuk, majd felolvasztottuk. Ezt 3x10 perces 0,1 M foszfát pufferben (pH 7,4) történő mosás követte, majd a metszeteket az endogén peroxidáz gátlása végett 1%-os hidrogénperoxid oldatban inkubáltuk. További 3x10 perces mosást követően a 3.5.1 pontban leírtaknak megfelelően elvégeztük a primer, szekunder antitestekkel és az ABC komplexszel az inkubálást, valamint az immunreakció láthatóvá tételét. Ezt követően a metszeteket 0,1 M foszfát pufferben (pH 7,4) 1 éjszakán át mostuk. Az elektronmikroszkópra szánt metszeteket ( $d=80\mu\text{m}$ ) 2% ozmium tetroxiddal, 1 órán át 4°C-on utánfixáltuk, majd kétszeres mosást követően felszálló alkoholsorban dehidráltuk 10-10 percig. A 70%-os alkohol 1% uranil-acetátot is tartalmazott a kontraszt felerősítése érdekében, mely utóbbiban 40 percet álltak a metszetek. A teljes vízelvonás érdekében abszolút alkoholban 2x20 percig, majd a műgyanta oldószerében: propilén oxidban 2x4 percig tartottuk a metszeteket.

Víztelenítést követően 1:1 arányú műgyanta (Durcupan) (ACM, Fluka, Gillingham, Dorset, UK) és propilén oxid keverékben 30 percet hagytuk állni, majd tiszta műgyantában 1 éjszakán át 56°C-on tartottuk. Másnap tiszta durcupanba helyeztük, szobahőn hagytuk állni, majd a metszeteket tárgylemezre tettük. A durcupannal átitatott metszeteket műanyag fedőlemezzel 1 éjszakára 56°C-os termosztátba helyeztük.

A „flat-embedding” módszerrel beágyazott metszetekből fénymikroszkóppal kiválasztottuk az elektronmikroszkópos vizsgálatra szánt területeket. A kiválasztott területeket kivágtuk, majd átágyasztuk, 2 napig 56°C-os termosztátban hagytuk, a durcupan polimerizációja érdekében. A blokkból készített ultravékony metszeteket

uranil-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztoltuk. A metszeteket Jeol típusú elektronmikroszkóppal értékeltük.

## 3.6 Állatkísérletes módszerek

### 3.6.1 Állatok

A kísérlethez 20-25 g-os hím Balb/c egereket használtunk (n=21). Az állatokat 24-25°C-os hőmérsékleten tartottuk, standard tápot és csapvizet *ad libitum* vehettek magukhoz. A kísérletet a PTE ÁOK Munkahelyi Állatetikai Bizottság szabályainak megfelelően végeztük.



3.6.1. ábra Balb/c egér tömegérése

### 3.6.2 Komplet Friend adjuváns (CFA) indukált arthritis modell

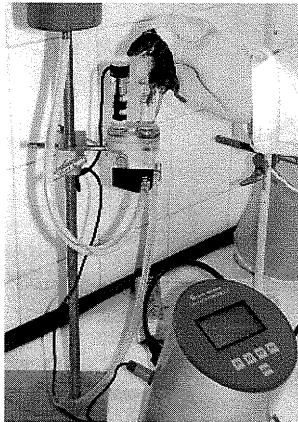
Az egér bal tibiotarsalis ízületének gyulladását a következő módon indukáltuk. A bal hátsó láb talpi felszínébe és a farktőbe paraffin olajban szuszpendált elölt Mycobaktériumokat tartalmazó komplet Friend adjuváns (CFA) juttatunk be (0,05 ml, 1 mg/ml s.c.). (Cat No. 0638-59 BACTO Difco Laboratoires, Detroit, Michigan, USA) A szisztémás hatás felerősítése céljából másnap azonos mennyiségű CFA-t injektáltunk a farktőbe (Helyes és mtsai, 2001).

A lábak térfogatát plethyszometriával, a talp mechanikus ingerekre való érzékenységet aesthesiometriás módszerrel határoztuk meg. Kontroll és kondicionáló méréseket végeztünk a CFA beadása előtt, majd az arthritis indukciót követő 3. 5. 7. 10. 12/13. 14/15. 17. 19. napokon.

### 3.6.3 Lábduzzadás mérése

A lábak térfogatát plethyszometriával mértük (Dynamic plantar plethysmometer 7140; Ugo Basile, Comerio, Italy), amelynek működése a közlekedőedények elvén alapul. A plethyszometer két függőleges, egymással kapcsolatban levő, speciális

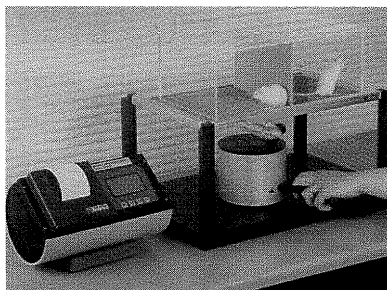
folyadékkal feltöltött plexiüveg cellából áll. A mérés során az egér lábát a nagyobb cellában lévő folyadékba merítjük. A kisebb csőben található transzducer regisztrálja a következményes térfogat-kiszorítást, és a digitális kijelzőn  $\text{cm}^3$ -ben leolvashatjuk a lábtérfogatot. A duzzadást a kontroll értékhez viszonyított %-ban adtuk meg.



3.6.2. ábra Lábduzzadás mérés Dynamic plantar plethysmometerrel

### 3.6.4 Mechanonociceptív küszöb mérése

A talp mechanikus ingerekre való érzékenységet aesthesiometriás módszerrel határoztuk meg (Dynamic plantar aesthesiometer 37400; Ugo Basile, Comerio, Italy). Az egerek egymástól elkerítve, egy fém rácson, szabadon mozoghattak. Behelyezésüket követően időt hagytunk az akklimatizációra a kutató-kereső magatartás befejezéséig. Ezt követően a rács alá helyeztük az állítható helyzetű tompa végű tűt tartalmazó stimuláló egységet. A talp megfelelő részének pontos pozicionálását a műszer állítható tűkre segítette. A start gomb megnyomását követően a tompa végű fémtű felemelkedett és fokozódó nyomást fejtett ki a talpra egészen addig, amíg az állat el nem rántotta a lábát. A láb elrántásának pillanatát, azaz a nociceptív küszöböt, a digitális kijelzőn gramm-ban leolvashattuk. A mechanikai allodiniát, azaz a nociceptív küszöb csökkenését, a kiindulási kontroll értékekhez viszonyított %-ban adtuk meg.



3.6.3. ábra Fájdalomküszöb mérés Dynamic plantar aesthesiometerrel

## 4 Kérdésfelvetések, vizsgálatok és eredmények

### 4.1 Egyes gyulladásgátló molekulák befolyásolják a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitását

#### A probléma háttere:

A MIF proinflammatorikus hatásának gátlásához jelenleg két út vezethet: vagy a MIF fehérje ellen termeltetett antitest, illetve a MIF anti-sense mRNS segítségével, - amelyek költséges és klinikai körülmények között nem mindig kivitelezhető módszerek -; vagy a MIF katalitikus aktivitását gátló kismolekulákkal.

Annak ellenére, hogy még nem ismert a MIF enzimaktivitásának jelentősége és szerepe, számos kutatócsoport próbált már MIF-et gátló kismolekulákat kifejleszteni-. Számítógépes modellek segítségével találtak már néhány ígéretes molekulát. Ezek közé tartozik például a (E)-2-fluoro-p-hidroxicinnamát (Taylor és mtsai, 1999), egyes dopachrom analógok (Zhang és Bucala, 1999), a Triptofán és Tirozin származékok (Dios és mtsai, 2002), vagy a kumarin- és chromenon származékok (Orita és mtsai, 2001). Ezek közül a chromenon származékok az eddigi legnagyobb affinitású MIF gátlók.

Munkacsoportunk korábban közölte, hogy a flavonoid luteolin és quercetin hasonló módon hat a marhaveséából izolált Sigma tautomerázra, mint a rekombináns humán MIF (rMIF) enzimaktivitására (Garai és Adlercreutz, 2004). A Sigma cég által forgalmazott tautomeráz és a rMIF Western immunoblot vizsgálattal is azonos helyen migrál. (Rosengren és mtsai, 1997). Ezek alapján feltételezhető, hogy a Sigma tautomeráz enzimaktivitását befolyásoló kismolekulák, azonos módon hatnak a humán rMIF-re is. A gátló molekulák vizsgálata során ezért a költséges rMIF helyett Sigma tautomerázt használtunk.

- Munkacsoportunk számos, eltérő szerkezeti csoportba tartozó, szintetikus előállított kismolekula hatását vizsgálta a MIF tautomeráz enzimaktivitására *in vitro*.

1. Gátlóként elsők között az acetaminophen teszteltük, melyről leírták, hogy gátolja a MIF dopachrom tautomeráz aktivitását (Senter és mtsai, 2002), ugyanakkor ezt a gátlót fenilpiruvát tautomeráz reakcióra még nem vizsgálták.
2. A MIF enzimaktivitását a továbbiakban olyan növényi hatóanyagokkal próbáltuk gátolni, melyeket a hagyományos medicinában gyulladáscsökkentő tulajdonságuk miatt alkalmaznak, és szerkezeti hasonlóságot mutatnak a MIF szubsztrátjaival.
3. Vizsgáltunk továbbá néhány ismert nem-szteroid gyulladásgátló szer (NSAID) hatását is ugyanezen reakcióra.
4. A gátlás típusára Lineweaver-Burk analízissel kívántunk választ kapni.
5. A legtöbb anyag enzimgátló hatékonyságát lemértük enoláz reakció irányában is.

#### Módszerek:

- A fenilpiruvát tautomeráz aktivitás ketonáz és enoláz reakciója.

#### Eredmények:

*Közlemény: Int. Immunopharm. 5, 849-856 (2005) (Lásd 10.1 fejezet 2. pont)*

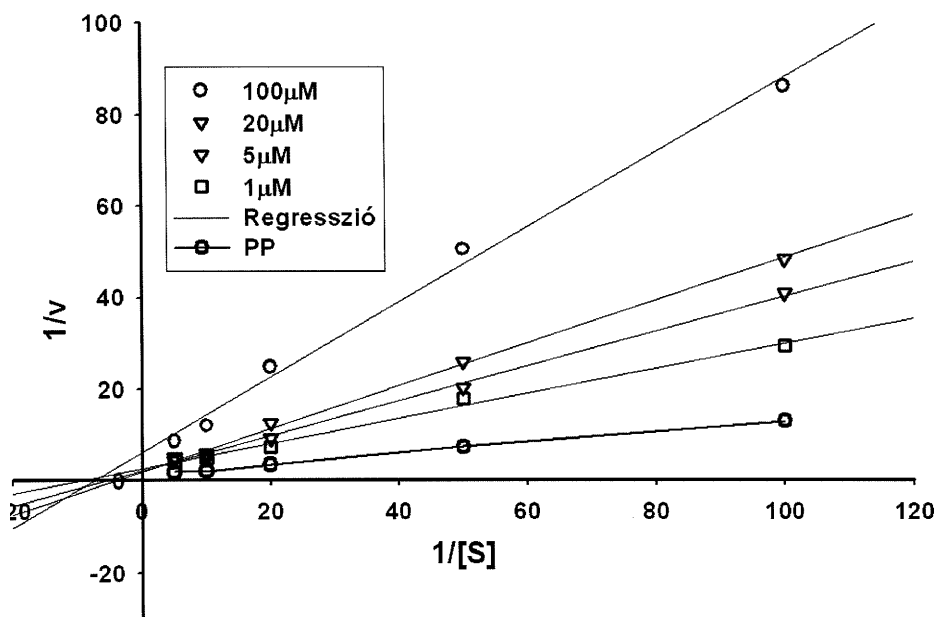
*Idézhető absztrakt: Acta Phys. Hung. 91, 334 (2004) (Lásd 10.2 fejezet, 3. pont)*

*Idézhető absztrakt: FEBS Journal 272 (s1), D3-020P (2005) (Lásd 10.2 fejezet, 7. pont)*

1. Az acetaminophen nem csak a MIF dopachrom tautomeráz aktivitását gátolta, hanem a fenilpiruvát tautomériát is ( $IC_{50}=1,0 \mu M$ ).
2. A vizsgált gyulladásgátló kismolekulák koncentrációfüggő módon gátolták a MIF mediált fenilpiruvát tautomeráz reakciót ketonáz és enoláz irányban. Kiszámítottuk a vizsgált anyagok félgátlási koncentrációit ( $IC_{50}$ ). Lásd 4.1.1. táblázat.
  - a. A MIF ketonáz reakciójára a leghatékonyabb gátlást a fenilpropán csoportba tartozó kávésav ( $IC_{50}=0,55 \mu M$ ) és kurkumin ( $IC_{50}=0,7 \mu M$ ) eredményezte.
  - b. A kumarin származékok közül az umbelliferon (7-hidroxi-kumarin ( $IC_{50}=2,6 \mu M$ )) jóval hatékonyabbnak bizonyult, mint a főmolekula (kumarin ( $IC_{50}=88,8 \mu M$ )), míg annak metoxi származéka a szkopoletin ( $IC_{50}=133,8 \mu M$ ) jelen rendszerünkben az egyik leggyengébb gátló volt.



- c. A vegyes szerkezetű csoportba sorolt vegyületek közül a vörösbokban, nagy mennyiségben előforduló, stilbén szerkezetű resveratrol ( $IC_{50}=1,9 \mu M$ ), a chalcon vázas floretin ( $IC_{50}=4,8 \mu M$ ), és a boldin alkaloid ( $IC_{50}=5,7 \mu M$ ) bizonyult hatékonynak; míg a flavon galangin ( $IC_{50}=36,9 \mu M$ ) csak lényegesen magasabb koncentrációkban mutatott gátlást. A pteridin származék folsav ( $IC_{50}=62,7 \mu M$ ), a folsav antagonistá methotrexáthoz ( $IC_{50}=15,6 \mu M$ ) képest, gyengébb gátlónak bizonyult. A partenolid, mely a *Tanacetum parthenium* fő hatóanyaga csak millimólos koncentrációban ért el 50%-os gátlást.
3. A nem-szteroid gyulladáscsökkentők közül a piroxicam volt a leghatékonyabb ( $IC_{50}=120,9 \mu M$ ), de MIF enzimgátló hatását tekintve messze elmarad a legtöbb növényi eredetű kismolekulától. A phenylbutazon ( $IC_{50}=7126,7 \mu M$ ) és az ibuprofen ( $IC_{50}=10334,3 \mu M$ ) csak millimólos koncentrációban mutattak gátlást.
4. Lineweaver-Burk plot analízis alapján a kávésav esetében a gátlás kompetíciós jellegű.



4.1.1 ábra Lineweaver-Burk analízis (kávéssavval)

5. Enoláz reakcióban a leghatékonyabbnak szintén a kávéssav bizonyult. Érdekes tapasztalat, hogy a NSAID-k ebben a reakcióban kivétel nélkül, legalább egy nagyságrenddel jobb  $IC_{50}$  értéket adtak, mint a ketonáz reakcióban. (Lásd 4.1.2. táblázat.)

### Következtetések:

A vizsgált fenolos vegyületek megtalálhatóak különböző természetes eredetű anyagokban, melyeket a népi gyógyászatban gyulladáisos állapotok kezelésére alkalmaznak. Nagy részük kifejezetten jó gátlónak bizonyult a gyulladáisos citokin tautomeráz aktivitását illetően.

A vizsgált nem-szteroid gyulladásgátlókról ismert, hogy keto és enol formában is jelen vannak, de egyikük sem volt hatékony gátlója a MIF enzimaktivitásnak, sőt csak nagyságrendekkel magasabb koncentrációkban mutattak gátlást. Ez azzal magyarázható, hogy a növényi hatóanyagok erős antioxidáns karaktere hozzájárulhat az *in vitro* rendszerünkben megfigyelhető hatáshoz. De a gátlás pontos mechanizmusát minden egyes vegyületnél külön tisztázni szükséges majd a továbbiakban.

A MIF ellensúlyozza a glükokortikoidok gyulladásgátló és immunszuppresszív hatását. Ezt úgy éri el, hogy ellensúlyozza a glükokortikoidok okozta gátlást a makrofágok citokin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) expressziójára, a T sejt proliferációra és citokin (IL-2, IFN- $\gamma$ ) produkciójára (Bacher és mtsai, 1996; Daun és Cannon, 2000; Wang és mtsai, 2002). A glükokortikoidok használatát az érzékeny szövetekben jelentkező, dózisfüggő mellékhatások korlátozzák (Boumpas és Wilder 2001).

Feltételezhető, hogy a glükokortikoid hatást ellensúlyozó MIF fehérje farmakológiai gátlása emeli az endogén glükokortikoid gyulladásgátló hatékonyságát. Ugyanakkor feltehetően csökkenteni képes a terápiás glükokortikoid-szükségletet krónikus autoimmun vagy gyulladáisos betegségek kezelésében.

## 4.2 Kémiai úton szintetizált kismolekulák hatása a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitására

### A probléma háttere:

Korábbi irodalmi adatokból és saját eredményeink alapján ismert, hogy a kávésav a MIF dopachrom (Senter és mtsai, 2002) és fenilpiruvát (Molnár és Garai, 2005) tautomeráz aktivitásának hatékony gátlója. A fenilpiruvát tautomeráz aktivitást az ősidők óta gyulladásgátlóként (Srimal, 1993), majd chemopreventív szerként (Duvoix és mtsai, 2005) használt kurkumin is gátolja (Molnár és Garai, 2005), de képes gátolni az oxidáció okozta TNF- $\alpha$  és IL-8 felszabadulást, és bizonyos vonatkozásokban képes visszaállítani a glükokortikoid funkciót. Ez utóbbi mechanizmusa jelenleg még nem ismert, de feltételezik, hogy háttérben a hiszton deacetiláz aktivitás helyreállítása is állhat (Rahman és mtsai, 2005).

Ezen előzmények arra ösztönöztek minket, hogy a ciklikus  $\alpha,\beta$ -telítetlen ketonok között- beleértve a kurkumin analógjait is - keressünk hatékony gátlókat. Ezen csoport tagjai közül például a 2,6-bisz(benzilidén)ciklohexanonokról ismert, hogy gátolják az úgynevezett II-es típusú ösztrogén kötő helyet (type II estrogen binding site (Type II ER)), valamint az emlő és prosztatara k sejtproliferációját (Markaverich és mtsai, 1992; Markaverich és mtsai, 1998). Dimmock és munkatársai (2000, 2002) pedig néhány 2-arilidén-benzocikloalkanon- és 2,6-bis(arilidén)ciklohexanon-származékról írta le, hogy az egér P388 és L1210 leukémia sejtekre citotoxikus hatású.

- Olyan vegyületeket kerestünk, melyek a legpotensebbnek talált növényi hatóanyagokhoz, illetve a MIF szubsztrátjaihoz részben hasonló szerkezeti tulajdonságokkal bírnak a gátló hatás fokozása céljából. Dr. Lóránd Tamás (PTE ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet) számos vegyületcsoportot szintetizált, melynek során különféle pozícióban más-más oldallánccal helyettesített vegyületeket nyert. Az így előállított vegyületeket elsősorban a MIF tautomeráz enol-keto irányú reakciójára teszteltük.

### Módszerek:

- A fenilpiruvát tautomeráz aktivitás ketonáz és enoláz reakciója.
- Az enzimkinetikai vizsgálatokra felhasznált vegyületek kémiai szintézisének lépéseit az alábbi közlemények írják le: (Lóránd és mtsai, 1996; Shih és mtsai, 2000; Al-Nakib és mtsai, 2001; Hallgas és mtsai, 2005).

### Eredmények:

*Kézirat közlésre előkészítve: (Lásd 10.1 fejezet 6.pont)*

*Konferencia: XII. és XIII. Federation of European Chemical Societies (FECHEM),  
Poszterek (Lásd 10.3.2 fejezet 7. és 13. pont)*

A szerkezet-hatás összefüggések igen komplexek, a különböző vegyületcsaládok, molekulavázak szerint valamennyire más összefüggéseket tapasztalunk. A szerkezet-biológiai hatás tanulmányozása miatt a vizsgált vegyületek aromás gyűrűje vagy elektronküldő, vagy elektronszívó funkciós csoportokat tartalmaz, melynek nagy szerepe van a kémiában és a biológiai hatásban.

1. A monobenzilidén-cikloalkanonok/ arilidén-cikloalkanonok egyszeresen telítetlen ketonok, melyekben van tautomerizációra lehetőség. Az öttagú gyűrűs vegyület (C5) az ideális gátló **(1)** ( $IC_{50}=6,24 \mu M$ ): minél nagyobb a gyűrű C atomszáma, annál jobban gyengül a gátlás. Lásd 4.2.1. táblázat.
2. Az fenilszubsztituált vegyületek közül a két legjobb hatású, tehát az öttagú **(1)** és hattagú **(2)** különböző pozíciókban helyettesített (metoxi-, halogén-, stb.) származékait vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a szubsztituátlan vegyülethez képest **(1)**, a szubsztitúció markánsan megváltoztatta az aktivitást. Lásd 4.2.2. táblázat.
3. A *para*-bróm szubsztituált vegyületnél a fél-gátlási koncentráció szubmikromoláris tartományba került **(13)** ( $IC_{50}=0,79 \mu M$ ), míg ha ugyanezen a helyen egy másik halogént, (klórt) tartalmazó származéknál a gátló hatás az alapmolekulához képest gyengült **(10)** ( $IC_{50}=25,36 \mu M$ ). A meglehetősen nagy elektronegativitású fluor bevitele a *para*-helyzetbe **(14)** a hatást igen lecsökkenti ( $IC_{50}=42,21 \mu M$ ). Lásd 4.2.2. táblázat.
4. Az aromás metoxi (-OCH<sub>3</sub>) csoportok helye is nagyban meghatározza a gátlást. A *para*- és az *orto*-szubsztituált vegyület közel azonos hatású **(7)** ( $IC_{50}=3,87 \mu M$ ), **(9)**

- ( $IC_{50}=2,48 \mu M$ ), míg a *meta*-származékkal (**8**) csak tízszer magasabb koncentrációban ( $IC_{50}=26,53 \mu M$ ) érhattünk el hasonló gátlást. Lásd 4.2.3. táblázat.
- Ha az fenilszubsztituált vegyületet, a 2-benzilidenciklohexanont (**2**), az aromás magban *p*-helyzetben helyettesítettük metoxi-csoporttal (**22**), a gátló-hatás jelentősen erősödött ( $IC_{50}=3,09 \mu M$ ). Hatása közel megegyezett az analóg ciklopentanon származékéval (**7**). A szubsztituált 2-arilidenciklohexanonokkal a megfelelő öttagú származékokhoz képest majd minden esetben magasabb  $IC_{50}$  értéket mértünk. Lásd 4.2.4. táblázat.
  - Hasonlóan a monobenzilidén-cikloalkanonokhoz, az öt szénatomszámú vegyület (**30**) volt a leghatékonyabb ( $IC_{50}=82,78 \mu M$ ), és a gyűrűtagszám növelésével a gátlás hatékonysága csökkent. Lásd 4.2.5. táblázat.
  - A 2-arilidénbenzocikloalkanonok (**33-50**) nem képesek tautomerizációra. A fenilszubsztituált vegyület (**31**) nem mutatott hatékony gátlást ( $IC_{50}=127,42 \mu M$ ), azonban, ha a fenilgyűrűt a bázisos 2-piridil csoporttal helyettesítettük (**50**), sokkal hatékonyabb gátlást érhattünk el ( $IC_{50}=5,63 \mu M$ ). Érdekes tapasztalat, hogy a (**8**) vegyülethez hasonlóan, a 3-helyzet (**49**) itt is gyengítette a gátló hatást ( $IC_{50}=20,26 \mu M$ ). Lásd 4.2.6. táblázat.
  - A *para*-helyzetben halogénnel szubsztituált 2-arilidén-1-tetralonok (**35,40,41**) a fenilszubsztituált vegyületnél jobb gátlást eredményeztek. A kétszeres halogén szubsztitúció ugyancsak megnöveli a hatást (**38**). Az elektronküldő csoportot tartalmazó anyagjaink közül a 4-metilszubsztituált vegyületnél az előbb említett (**38**)-cal megegyező aktivitás tapasztalható. Lásd 4.2.5. táblázat.
  - Az aciklikus ketonok közül a benzilidénacetone (**51**) mutatott legerősebb gátló hatást ( $IC_{50}=1,18 \mu M$ ). A kétszeres metil szubsztitúció (**52**) közel 50-szer, a három metil csoport bevitele (**53**), közel 100-szor gyengébb hatást eredményezett. Lásd 4.2.7. táblázat.

#### Következtetés:

A kapott eredmények, azaz a szerkezet hatás összefüggések értékelését csak vegyületcsaládonként végezhetjük, mivel ezek a szabályosságok általában a csoportokra jellemzők. A szerkezet hatás összefüggésekben sok más paraméter mellett valószínűleg szerepet játszanak a vizsgált molekulák szerkezet- és elektronikus tulajdonságai is.

A 2-arilidencikloalkanonok csoportjából a leghatásosabb vegyületek: a 4-brómfenil- (**13**) és a piperonilidén-származék (**18**) (Lásd 4.2.2. táblázat). A hattagú

gyűrűs vegyületeknél észlelt hatás rendszerint kisebb mértékű vagy hasonló a ciklopentanon-származékoknál észleletekhez.

A 2-arilidénbenzocikloalkanonok az előző családokhoz képest kisebb mértékű gátló hatással rendelkeznek, kivéve a bázisos 2-piridilszármazékot.

Bár a szintetizált vegyületek között volt, amelyekkel a növényi hatóanyagokét megközelítő hatást értünk el, de azok legpotensebb képviselőinek gátló hatását eddig még nem tudtuk túlszárnyalni. További vizsgálataink tervezéséhez felhasználjuk a QSAR (kvantitatív szerkezet hatás összefüggések) módszert is, hogy hatékony lead molekulát nyerjünk.

### 4.3 Ketontestek hatása a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitására

#### A probléma háttere:

Miközben a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitásának gátlóit kerestük, felfigyeltünk arra, hogy savas CH-csoport jelenléte fontos lehet a megfelelő gátlás eléréséhez. Erősen savas CH-csoporttal rendelkező modell molekulák közül az acetilaceton különösen érdekes volt, mert ismert róla, hogy tautomerizációra képes (Watarai és Suzuki, 1974). Az acetilacetonnal rokon szerkezetű ketontestek-acetoacetát,  $\beta$ -hidroxi-vajsav és az aceton- szintén CH-savas természetűek.

A ketontestek *in vitro* befolyásolják a marha fehérvérsejtek migrációját (Suriyasathaporn és mtsai, 1999), mely csökkentheti az immunkompetenciát. Ugyanakkor a ketontestek gyulladásgátló hatását is leírták (Sato és mtsai, 1992; Sjögren és mtsai, 1999).

Diabeteses és éhezési állapotokban változhatnak bizonyos sejtes immunvédekezési funkciók. Éhezésben és nem kezelt diabetesben a nagymértékű zsírsav ellátottság miatt megemelkedik a máj ketontest termelése. A hyperketonaemia fokozza az LDL oxidációs képességét (Jain és mtsai, 1998). Ez azért lehet jelentős, mert az atherogenesisben kulcsfontosságú az oxidált LDL-t (ox-LDL) felvevő makrofág eredetű ún. habos sejtek jelenléte. Az atheroscleroticus plakkokban jelenlevő MIF (Burger-Kentischer és mtsai, 2002) pedig fokozza a makrofágok ox-LDL felvételét (Atsumi és mtsai, 2000). De kimutatták, hogy a makrofágok részt vesznek a rheumatoid arthritisben is (Leech és mtsai, 1999), melyben szintén fokozódik a synoviális makrofágok ox-LDL felvevő képessége (Winyard és mtsai, 1993). A gyulladáscsökkentő

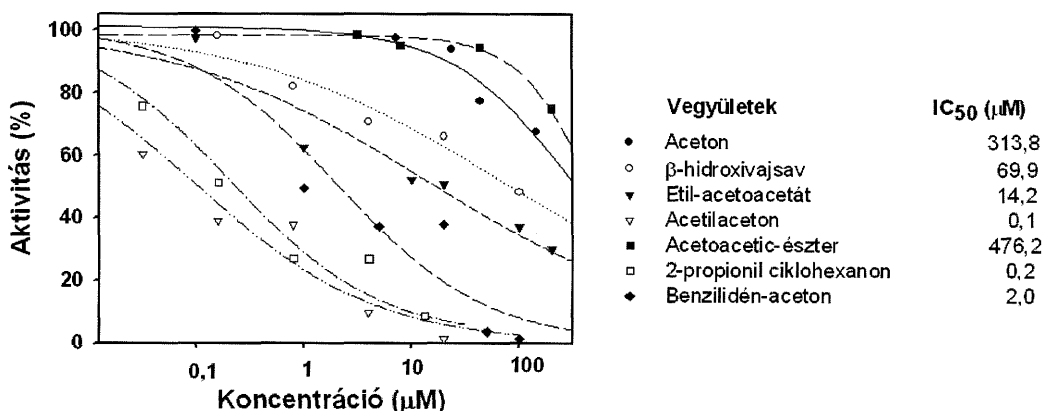
izületből származó synoviális folyadék azonban nem csak jelentős MIF tartalommal bír (Morand és mtsai, 2002), hanem megemelkedett az LDL oxidációt eredményező ketontestek szintje is (Naughton és mtsai 1993).

- Az alábbi kísérletekben ketontestek hatását vizsgáltuk a proinflammatorikus MIF citokin ketonáz és enoláz enzimaktivitásaira.

Eredmények:

Közlemény: *Life Sciences*, Vol 77, 1375-1380, (2005) (Lásd 10.1 fejezet 3.pont)

1. A ketontestek képesek gátolni a MIF ketonáz aktivitását. A MIF fenilpiruvát ketonáz aktivitásával szemben a legjobb gátló az acetilaceton és a 2-propionil ciklohexanon volt. A benzilidén-aceton, az acetoacetát, és a  $\beta$ -hidroxi-vajsav mérsékelt gátlónak bizonyult, míg az aceton és az etil-acetoacetát csak nagyságrendekkel magasabb koncentrációkban mutatott gátlást.



4.3.1. ábra MIF fenilpiruvát ketonáz gátlása ketonokkal

2. A MIF fenilpiruvát enoláz aktivitására a ketontestek 10 mM-ig nem hatottak. Az acetilaceton, a benzilidén-aceton és a 2-propionil-ciklohexanon IC<sub>50</sub> értékei az enoláz reakcióra sorrendben: 9,2 mM, 154 µM és 137 µM voltak.

Következtetések:

Az acetoacetát és a  $\beta$ -hidroxi-vajsav vérszintje fiziológias állapotokban 70-150 µM között van (Kalapos és mtsai, 2003). Ezek *in vitro* MIF ketonáz aktivitást gátló hatását tekintve (IC<sub>50</sub>= 14 és 70 µM) feltehető, hogy *in vivo* is képesek lehetnek a MIF enzimaktivitását befolyásolni.

Régóta ismert, hogy az éhezésben fellépő bakteriális fertőzés képes ellensúlyozni az éhezés során jellemző szérumban ketontest emelkedést (Neufeld és mtsai, 1976), sőt táplált állapotban is képesek a fertőzések csökkenteni a ketontestek vérszintjét (Lanza-Jacoby és mtsai, 1990). Ugyanakkor azon éhezőkben, ahol nincs gyulladásos reakció megemelkedett a ketontestek szintje (Kaminski és mtsai, 1979).

A gyűrűs struktúrával nem rendelkező ketonok úgy tűnik *in vitro* preferenciálisan a MIF ketonáz aktivitását gátolják (Garai és mtsai, 2005). Azonban az, hogy van-e összefüggés az *in vivo* jelentkező hyperketonaemia és a MIF citokin vagy nem-citokin funkciója között, még tisztázásra vár.

Feltételezéseink szerint, ha igaz, hogy a ketontestek *in vivo* is gátolják a MIF ketonáz aktivitását, és ennek az enzimaktivitásnak szerepe van a MIF citokin funkciójában, akkor a gazdaszervezet és a behatoló ágens szempontjából is kulcsszerepe lehet annak az ismert jelenségnek, hogy az infekció megakadályozza az éhező állatok ketontest termelését (Neufeld és mtsai, 1976).

#### **4.4 Egyes lipopoliszacharidok befolyásolják a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitását**

##### A probléma háttere:

A MIF és LPS bevezetőben említett kapcsolatát figyelembe véve felmerült, hogy az LPS esetleg közvetlenül is befolyásolhatja a MIF tautomeráz aktivitását.

A vérbe került LPS az LPS-kötő fehérjéken (LBP) keresztül monocytákban, makrofágokban és neutrofileken a CD14 molekulához kötődik (Haziót és mtsai, 1997), mely szignált ad a receptor komplex másik tagja, a Toll-like receptor-4 (TLR4) felé. A MIF és LPS további kapcsolatára utal, hogy képes megemelni a TLR4 expresszióját (Roger és mtsai, 2001).

Az LPS a toxikus hatásért felelős lipíd A-ból, külső és belső magból (core), valamint a változatos felépítésű O-specifikus poliszacharid oldalláncból áll.

1. Különböző baktériumok teljes LPS-einek, valamint azok alegységeinek hatását teszteltük a MIF enzimaktivitására. Az LPS-ek közül vizsgáltuk az *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella adalaid* és *Salmonella sonnei* II teljes lipopoliszacharidját (WLPS).



2. Továbbá a *Salmonella adalaid* Lipid-A és az ún. DPS komponensét, mely utóbbi a 2-keto-3-dezoxi-oktonsavat (KDO) és az "O-oldalláncot" foglalja magába.

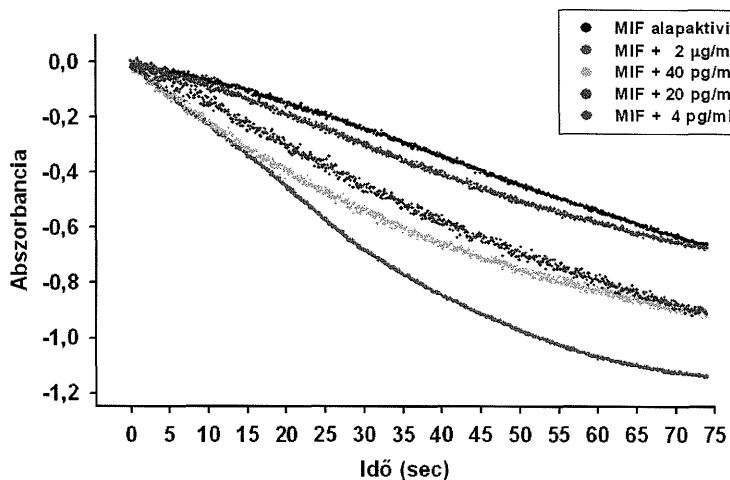
#### Módszerek:

- A ketonáz és enoláz enzimreakciókat az előzőekhez hasonlóan végeztük, de nem 20°, hanem 39°C-on.
- A kísérletben használt LPS-eket a PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetből, dr. Kocsis Béla jóvoltából kaptuk.
- Az LPS koncentrációkat a szérum toxikus (40pg/l), „köztes” (20pg/l) és subklinikai (4pg/l) koncentrációinak megfelelően használtuk.

#### Eredmények:

Idézhető absztrakt: *Acta Phys. Hung.*, 91, 297 (2004) (Lásd 10.2. fejezet 4. pont)

1. Az *E. coli* és a *Salmonella sonnei* II LPS-e 39°C-on koncentráció-függő módon serkenti a MIF tautomeráz aktivitásait. A *Salmonella adalaid* teljes lipopoliszacharidja mind az enoláz, mind a ketonáz reakciót koncentrációfüggő módon gátolta, de a gátlás enoláz irányban sokkal erőteljesebb volt.



4.4.1. ábra *E.coli* "O83" hatása a MIF ketonáz reakciójára

2. A *Salmonella adalaid* Lipid-A komponense 39°C-on koncentrációfüggő módon serkenti az enzimreakciót, DPS komponense töményebb (1mg/ml, 40pg/l) koncentrációkban gátló, alacsonyabb koncentrációkban (20pg/l, 4pg/l) serkentő hatást mutatott.

### Következtetések:

Az eltérő szerkezetű LPS-ek koncentrációfüggő módon befolyásolták a MIF tautomeráz aktivitását.

A reakció gátló vagy serkentő irányát nagyban meghatározta az LPS szerkezeti felépítettsége is.

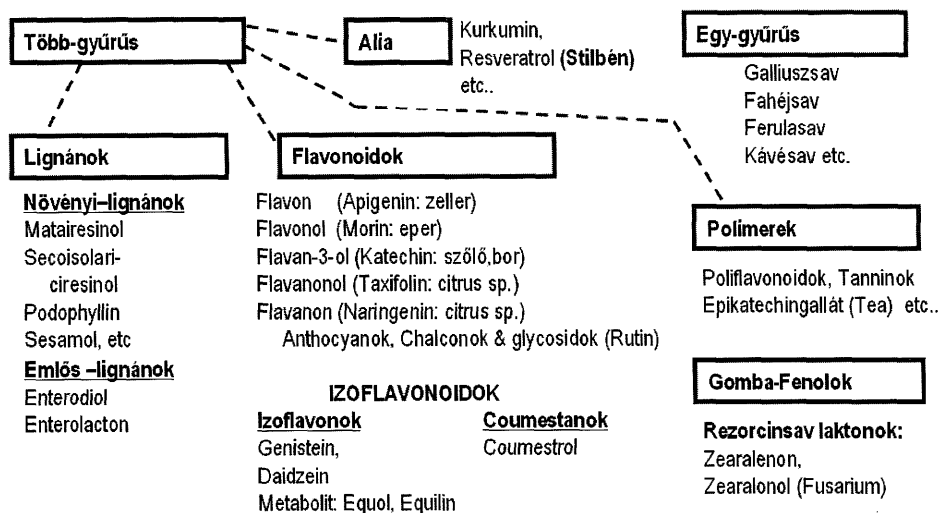
## **4.5 Flavonoidok és fitoösztrogének befolyásolják a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitását**

### Flavonoidok és fitoösztrogének:

A flavonoidok C6-C3-C6 (difenilpropán) alapszénvázú vegyületek. A két benzolgyűrű (A és B) egy oxigénatomot tartalmazó heterociklikus pirán-, vagy pirongyűrűn (C gyűrű) keresztül kapcsolódik egymással. Ez az alapváz rendkívüli változatosságot biztosít mind a szubsztituensek, mind a szénváz szerkezetében, így jelenleg mintegy 4000-féle különböző szerkezetű, természetes forrásból származó flavonoidot ismerünk (Harborne, 1988). Számos irodalmi adat bizonyítja a flavonoidok antioxidáns, antikarcinogén és gyulladáscsökkentő; összességében egészségvédő és betegségmegelőző hatékonyságát (Rice-Evans és Diplock, 1993; Cadenas és Packer, 1996; Rice-Evans és Packer, 1998).

A fitoösztrogének a növényi polifenolok közé tartoznak. Az 1940-es években ismerték fel, hogy néhány növényi eredetű hatóanyag képes az ösztrogén hormonhatásával interferálni (Bennetts és mtsai, 1946). Azon juhok között, amelyek egy vöröshere fajból (*Trifolium subterraneum Dwalganup alfaja*) nagy mennyiségben legeltek, gyakran lépett fel fertilitási zavar. Sőt, a még nem ivarérett állatok is az ösztrozis jeleit mutatták, ugyanakkor a terhesség elmaradt. Ha a megtermékenyülés be is következett, sok volt a vetélés. Kimutatták, hogy a juhok által fogyasztott vörösherében nagy mennyiségben fordulnak elő izoflavonok, formononetin és biochanin-A (Rossiter és Beck, 1966). Ezek voltak az elsőként leírt növényi eredetű ösztrogének, azaz fitoösztrogének.

Jelenleg a növényi eredetű polifenolok öt alcsoportjában ismerünk fitoösztrogén hatással rendelkező vegyületeket. Ezek az izoflavonoidok, a kumesztánok, a rezorcinsav laktonok (gomba ösztrogének), a lignánok, és a stilbének. E csoportok tagjai, az ER alfához és/vagy bétához kötődve hoznak létre ösztrogén-mediált választ.



4.5.1. ábra Növényi fenolok és polifenolok

A szójában és egyéb hüvelyesekben található genistein és a daidzein, valamint - ez utóbbi metabolitja- az equol, az izoflavonoidokon belül is az izoflavonok csoportjába tartoznak. A kumesztánok ösztrogenitás szempontjából legaktívabb tagjai a kumösztról és a metoxikumösztról. A kumösztról leggazdagabb forrásai egyes hüvelyes növények, a herefélék, de kis mennyiségben megtalálhatóak a kelbimbóban és a spenótban is (Knuckles és mtsai, 1976; Wang és mtsai, 1990; Franke és mtsai, 1994). A rezorcinsav laktonok forrásai bizonyos penész-gombák (tehát nem növényi-, hanem gomba ösztrogének). A lignánok legnagyobb mennyiségben, a lenmagban találhatóak meg. A növényi lignánok az emlős szervezetben a bélflóra hatására enterodiollá és enterolaktonná alakulnak. Az enterodiol és az enterolakton gyenge ösztrogénszerű hatással rendelkezik (Setchell és mtsai, 1981; Glisto és mtsai, 2000). A fitoösztrogén stilbének legfontosabb képviselője a szőlőmagban, a vörösborsban és a keserűfűben (*Polygonum cuspidatum*) előforduló resveratrol. Két izomerje ismert (*cisz* és *trans*), de csak a természetben túlnyomóan előforduló *trans*-resveratrolnak van ösztrogénszerű hatása (Gehm és mtsai, 1997).

1978-ban patkány uterusban felfedeztek egy olyan nukleáris kötőhelyet, mely az ösztrogén receptornál ugyan jóval alacsonyabb affinitással, de képes volt megkötni az ösztrogént (Eriksson és mtsai, 1978). Ez az ún. II-es típusú kötőhely nem csak az ösztrogént, hanem a flavonoidok egy részét is (meglehetősen nagy affinitással) köti (Markaverich és mtsai, 1988). Ezt a kötőhelyet a patkány uterus magfrakciójából történő fehérjetisztítási procedúrában egy tirozináz szerű enzimaktivitással együtt detektálták (Garai és Clark, 1992). Egy közleményben a két aktivitás chromatográfiás elválasztásáról számoltak be (Densmore és mtsai, 1994). Mivel a tirozináz aktivitás

szubsztrát-specifitása a MIF tautomerázéhoz hasonló, és a II-es típusú kötőhely flavonoid ligandjai gátló hatásúak voltak a MIF tautomeráz aktivitására felvetődött a lehetőség vélt kapcsolatukról (Garai és Adlercreutz, 2004). A II-es típusú nukleáris ösztrogén kötőhely preprátumban Western blot vizsgálattal MIF immunoreaktivitás volt detektálható. Patkány uterus sejtmag kivonatában, ami a II-es típusú kötőhelyet tartalmazta, MIF-hez hasonló tautomeráz aktivitást is kimutattak (Garai és mtsai, 2001). Ezen adatok arra utalnak, hogy a MIF-nek szerepe lehet az u.n. II-es típusú ösztrogén kötődésben.

1. A MIF és a II-es típusú kötőhely feltételezett kapcsolata miatt, a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitására vizsgáltuk olyan flavonoidok hatását, melyek jó ligandjai a II-es típusú ösztrogén kötőhelynek
2. Vizsgáltunk továbbá néhány olyan fitoösztrogént, melyekről ismert, hogy képesek a csontsűrűséget jótékonyan befolyásolni (Fanti és mtsai, 1998).
3. Ösztrogénhatással nem bíró flavonoidokat is vizsgáltunk, melyek pl. gyulladásgátló hatással bírnak. Ezek kémiai szerkezete vagy a fitoösztrogénekhez hasonlít (pl. a naringenin a genisteinhez), vagy a már korábban hatékonynak bizonyult növényi vegyületekhez.

#### Eredmények:

*Konferencia: Magyar Élettani Társaság LXIX. Vándorgyűlése, Előadás (Lásd 10.3.1 fejezet, 10. pont)*

1. A II-es típusú kötőhely ligandjai közül vizsgáltuk a dietil-stilbösztrolt (DES) és a 2-metoxi ösztradiolt. Mind a szintetikus ösztrogén (DES), mind az ösztrogén metabolit 2-metoxi-ösztradiol részleges gátló hatást mutatott (Garai és Adlercreutz, 2004).
2. A csontanyagcserét befolyásoló fitoösztrogének közül a MIF ketonáz reakcióját legeredményesebben a daidzein gátolta ( $IC_{50}=16,33 \mu M$ ). Ezt követte annak metabolitja, az equol, majd a genistein. Azonban, ha az enoláz irányú reakciót vesszük figyelembe, a gátlás erőssége a daidzein és genistein esetében gyakorlatilag azonos ( $IC_{50}=21,33 \mu M$ , és  $IC_{50}=21,40 \mu M$ ), de az equolé is csak egy kicsivel gyengébb.

3. A vizsgált flavonoidok ketonáz reakcióra közel azonos gátló hatást mutattak. Az ellagin sav egy málnában is előforduló fenol származék (Siriwoharn és Wrolstad, 2004), amelyről leírták, hogy sejtenyészetben gátolja bizonyos rákos sejtek növekedését (Dorai és Aggarwal, 2004). Vizsgálatunkban ketonáz reakcióban  $IC_{50}=20,52 \mu\text{M}$ , enoláz reakcióban  $IC_{50}=140,8 \mu\text{M}$  hatást mutatott. A morin flavonoid az eperfában (*Morus alba*, *Morus nigra*) található ismert antioxidáns-, és LDL-oxidációt gátló hatású molekula (Wu és mtsai, 1959; Zhu és mtsai, 2000). Az enoláz reakcióban ( $IC_{50}=16,9 \mu\text{M}$ ) közel kétszer olyan jó gátlást eredményezett a ketonázhoz képest ( $IC_{50}=32,63 \mu\text{M}$ ). A naringenin fő forrásai a citrusfélék (Peterson és mtsai, 1998; Ranganna és mtsai, 1983). Ketónáz irányban az előzőkhöz hasonlóan hatott ( $IC_{50}=29,52 \mu\text{M}$ ), azonban az enoláz reakcióban gyengébbnek bizonyult ( $IC_{50}=73,92 \mu\text{M}$ ). Lásd 4.5.1. táblázat.

#### Következtetések:

Az általunk tesztelt flavonoidok és a fitoösztrogének szintén képesek a MIF enzimaktivitását befolyásolni, de gátló hatásuk elmaradt a korábban vizsgált gyulladásgátló növényi hatóanyagokétól.

Bár jelen pillanatban nincsenek ismereteink a MIF fenilpiruvát enoláz és ketonáz irányú reakciójának biológiai szerepéről, mégis említésre érdemes, hogy az ösztrogenitás szempontjából leghatékonyabb equol az enoláz irányú reakcióban a többi vegyülettől eltérően eredményesebbnek bizonyult.

## 4.6 MIF mennyiségének és aktivitásának vizsgálata humán mintákban

### A probléma háttere:

Rheumatoid arthritises (RA-s) betegek ízületi folyadékához hasonlóan, az endometriosisos betegek peritonealis folyadékában is megemelkedett a MIF koncentrációja. Biológiai minták MIF enzimaktivitását még nem vizsgálták.

- Vizsgáltuk ízületi folyadékok, szérumok és peritonealis folyadékok MIF immunoreaktivitását a minta tautomeráz enzimaktivitásával korrelációban.
- Vizsgáltuk endometriosis egyes stádiumaiban a MIF ELISA-val mérhető szintek, valamint az enzimaktivitás között; illetve a különböző típusú ízületi megbetegedésekben a MIF tartalom és az enzimaktivitás mértéke közötti korrelációt.
- A MIF inhibitorként általunk azonosított gyulladásgátló néhány kismolekula hatását is teszteltük az ízületi folyadékban, ill. peritonealis-folyadékban található MIF enzimaktivitásra.
- A bélmegnyitással járó és bélmegnyitással nem járó hasi műtéteken átesett betegek szérumából pedig a MIF és egyéb citokinek változását követtük.

### Módszerek:

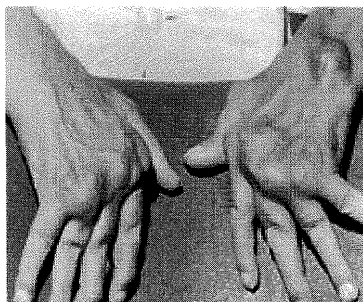
- A minták MIF tartalmának mérése:
  - Western immunoblot
  - ELISA módszerrel
- Az enzimaktivitás mérésekhez 40, 60 és 100 µl mintát használtunk fel.
  - ketonáz (fenilpiruvát szubsztráttal)
  - enoláz irányban (Na-fenilpiruvát szubsztráttal).
- A vizsgálati protokoll az Orvosok Világszövetségének Helsinki Deklarációjának aktuális módosított változatában foglaltak ill. az orvos-biológiai kutatásokról hozott 11/1987 (VIII.19) EüM számú rendelet szabályainak mindenben megfelelt. A vizsgálatba bevont személyek érdekeit a vizsgálat során, az etikai irányelvek szerint messzemenően figyelembe vettük. Az önként jelentkezők a

vizsgálat céljairól és lehetséges kockázatairól kimerítő írásos és szóbeli tájékoztatást kapnak, és felmerülő kérdéseikre további magyarázattal is szolgáltak a vizsgálatban közreműködők. Részvételi szándékát mindegyik önkéntes a Belépési Nyilatkozat ("Tájékozott beleegyezés / Informed consent") szignálásával személyesen érvényesítette.

#### **4.6.1 MIF mennyisége és aktivitása ízületi gyulladásban szenvedők ízületi folyadékában és szérumban**

##### A probléma háttere:

A rheumatoid arthritis (RA) a felnőtt lakosság kb. 1%-át érintő, szisztémás, krónikus, sokízületi, autoimmun eredetű gyulladásos megbetegedés, mely lappangva, leggyakrabban a fiatal nőknél kezdődik 20-40 év között. Első jele általában a kézujj végperceinek duzzanata, fájdalmassága, merevsége. A fájdalmasság miatt a beteg ezt az ízületét nem használja, ezért az megmerevedik és a hozzá tartozó izmok elvékonyodnak, sorvadnak. Néha az ujjak elgörbülnek, kihegyeződnek és jellegzetes torz kéztartás fejlődik ki.



**4.6.1. ábra A rheumatoid arthritis típusos képe a kézfejen**

A folyamat sok esetben itt megáll, de az ízületmerevedés több ízületre, gyakran nagy ízületekre is ráterjedhet, amelyek aztán kezelés nélkül nagyfokú mozgáskorlátozottságot, vagy mozgásképtelenséget okoznak. Néha megtámadja a szervezet egyéb területeit is, mint a szemet, tüdőt, és esetenként a szívet is.

Szövettanilag a betegség kialakulása során az addig hypocelluláris synoviumban számos sejt felszaporodik, különösen a monocyták, makrofágok és a Th1 T-lymphocyták. Ezen sejteket különféle tényezők befolyásolják, mint a chemokinek (monocytá chemoattraktáns protein 1 (MCP1)), az eredetileg ott lévő sejtek rendellenes és fokozott apoptózisa, különféle citokinek (TNF, GM-CSF, granulocytá-makrofág-colonia-

stimuláló faktor (GM-CSF) és interleukinek (IL-1, IL-6, IL-8, IL-15 és IL-17) (Smolen és Steiner, 2003). A citokinek különféle mediátorok (prostaglandin E<sub>2</sub>) felszabadítása révén hozzájárulnak a fájdalomhoz és a duzzanathoz, továbbá a mátrix metalloproteinázok (MMP), aggregánok és az osteoclast aktivációban részt vevő fehérjék (RANKL (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ligand) által az ízületek károsodásához. A MIF az itt felsorolt jelenségek majd' mindegyikében részt vesz, ami a MIF rheumatoid arthritisben betöltött szerepének jelentőségét támasztja alá.

#### A vizsgálatban résztvevő betegek:

A vizsgálatot a PTE ÁOK Immunológiai és Reumatológiai klinika közreműködésével (Intézet igazgató: prof. Dr Czirják László) végeztük. A programban azok a RA-ban szenvedő vagy egyéb ízületi gyulladásos panaszokkal jelentkező betegek vettek részt, akiknél a kivizsgálás, valamint a kontrollvizsgálatok során a synovitis és az arthropathia verifikálására, a RA stádiumának meghatározására, illetve a gyulladt ízület tehermentesítése céljából ízületi punkció vált szükségessé, mellyel párhuzamosan vérvétel is történt. A punkció előtt a személyzet ízületi érzéstelenítést végzett, annak eldöntésére, hogy a beteg fájdalma ízületi eredetű-e. Az ízületi eredetű fájdalom az érzéstelenítés után gyorsan megszűnt.

Beválasztási feltételek között alapfeltétel volt a kontroll vizsgálaton való megjelenés, valamint a beleegyezés. Továbbá a 18-80 év közötti beteg térdízülete tartalmazzon kóros mennyiségű folyadékot.

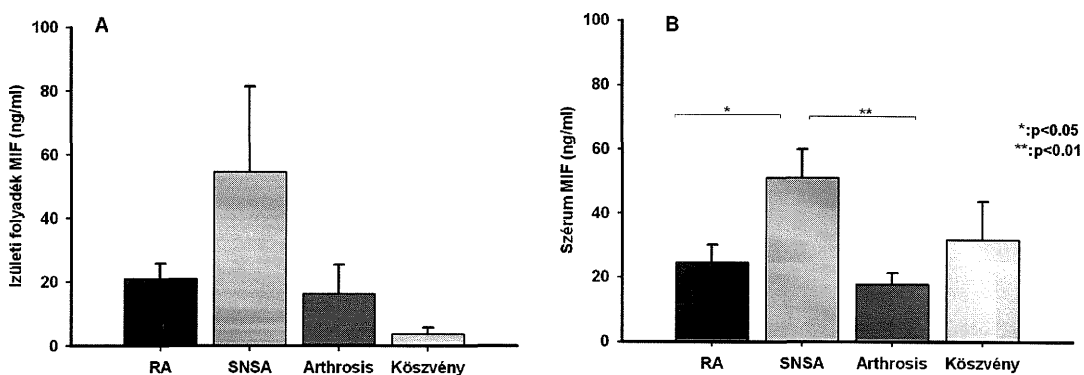
Kizáró okok közé az ízületi punkció elvégzését kizáró/akadályozó állapotok tartoztak: az adott bőrfelület gyulladása, a véralvadás zavarai (terápiás antikoaguláció), protézis, illetve, ha a beteg nem egyezett bele, vagy nincs kellő kooperáció a részéről. További kizárási kritérium volt, ha a vizsgálat időpontja körül a beteg fogyasztott növényi hatóanyagokat tartalmazó antirheumatikus komplementer medicinákat.

- Diagnózisok szerint csoportosítva:
  - Rheumatoid arthritis (RA): n=13
  - Szeronegatív Spondylarthritis (SNSA): n=10
  - Arthrosis n=8
  - Arthritis urica (köszvény) n=4



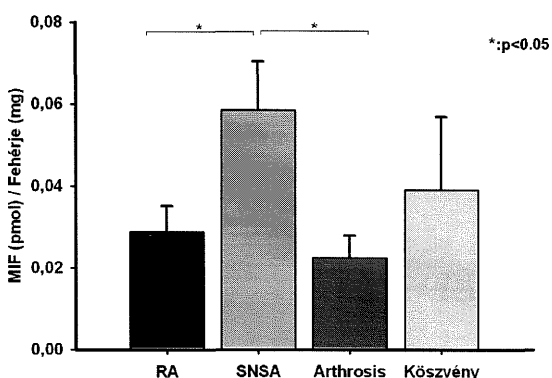
## Eredmények:

1. Ízületi gyulladásban szenvedő betegektől (n=35) gyűjtött szérumban és ízületi folyadékban ELISA vizsgálattal megemelkedett MIF szinteket mértünk. Az egyes betegségeket összehasonlítva SNSA-ban az ízületi folyadékok MIF tartalma magas, de a szérumok MIF tartalma között már szignifikáns különbség van mind a rheumatoid arthritises (\*:p<0.05), mind az arthrosisos (\*\*:p<0.01) csoporthoz viszonyítva.



4.6.2. ábra Ízületi folyadék (A) és szérumok (B) MIF tartalma az egyes betegségekből

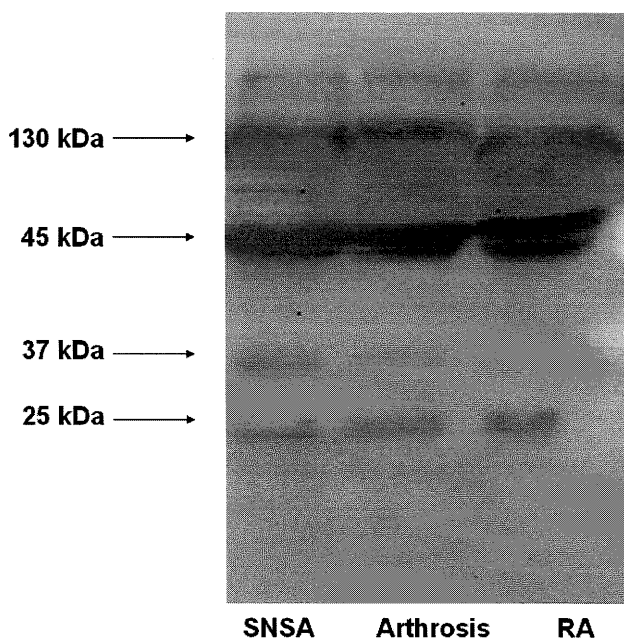
Hasonló különbség mutatható ki a szérumok egységnyi fehérjére vonatkoztatott MIF tartalma között is.



4.6.3. ábra Szérum MIF tartalom egységnyi fehérjére vonatkoztatva

2. A megemelkedett MIF szintek ellenére a vizsgálati mintákban konzisztensen csak fenilpiruvát enoláz aktivitást tudtunk kimutatni, melynek mértéke rheumatoid arthritises szérum esetében korrelált a MIF immunoreaktivitásával.

3. Ketonáz irányban, ugyanabban a koncentrációban abszorbancia csökkenést nem észleltünk, azonban ha az ízületi folyadékot különböző mértékben hígítottuk, némi abszorbancia csökkenés már láthatóvá vált, de ez nem volt következetesen reprodukálható.
4. Az ízületi folyadék enoláz aktivitását a vizsgált MIF inhibitorok hatékonyan gátolták.
5. Western blot vizsgálattal is igazoltuk a MIF jelenlétét. Kiemelendő azonban, hogy a MIF immunoreaktivitás nem csak a dimer (25 kDa) és trimer molekulásúlyának megfelelő 37 kDa-nál migrál, hanem a 130, 45 kDa molekulásúly tartományban is.

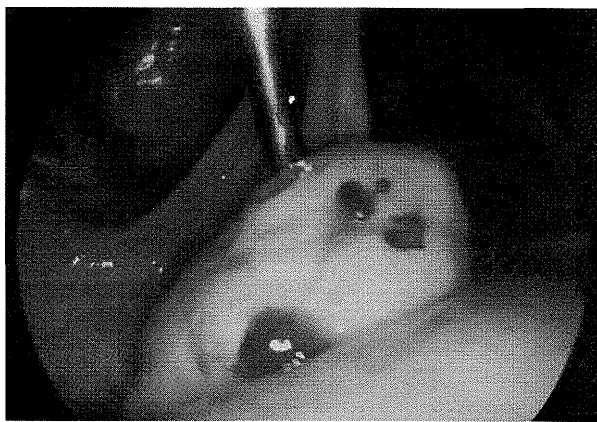


4.6.4. ábra Szérum minták Western blotja anti-MIF antitesttel

#### 4.6.2 MIF mennyisége és aktivitása humán endometriosisos betegek peritonealis folyadékában

##### A probléma háttere:

Az endometriosis nevéhez híven azt a kórállapotot jelöli, melyben az endometrium (méhnyálkahártya) egyes szigeteinek nemcsak a méh üregében, hanem a szervezet más helyein (ektópiás) is fennmaradnak. A méhnyálkahártya benőhet a méh izmos falába (adenomyosis), vagy megtapadhat a méhkürtben is. Az endometriotikus plakkok tipikus előfordulási helye azonban a sacrouterin szalag, illetve a Douglas zsák.



4.6.5. ábra Endometriosis képe hastükrözéssel

A méhen kívül a endometriosisban szenvedők kismedencei szerveiben máshol is lehet találni endometriosisos csomókat, pl. a petefészekben, a méhnyakon, a hüvelyben vagy akár a gát-tájékon. Jellemző sajátosságuk, hogy hormonhatásra reagálnak. Így a havi vérzés ideje alatt ezek az "eltévedt" méhnyálkahártya-szigetek szokatlan helyeken vérezni kezdenek. Etiológiája ma is tisztázatlan, de kialakulását illetően a legelfogadottabb nézet szerint, a menstruációs váladék csak részben távozik a hüvelyen keresztül, egy kis része viszont a petevezetőkön át a hasüregbe folyik vissza, ezt hívják "retrográd menstruációs, vagy transtubaris migratio" elméletnek. A jelenséget elősegíti, ha a méh nyakcsatornája túlságosan szűk, és/vagy a havi vérzés erős (esetleg retroperisztaltikus) méh- v. kürt motilitással jár.

Az endometriosis diagnózisa mindaddig bizonytalan, amíg azt hastükrözés (laparoscopia) útján vett szövettani vizsgálattal nem igazolják. A laparoscopia során meg lehet határozni a betegség elhelyezkedését, kiterjedtségét, ezek alapján a stádiumot, valamint lehetőség van peritonealis folyadék nyerésére is. A peritonealis folyadékban számos immun- és gyulladásos mediátor szintje megemelkedik. Yang és mtsai (2000) kimutatták, hogy az endometrium sejtekből származó MIF elősegíti az endothel sejtek

növekedését, ebből arra következtettek, hogy a MIF felelős lehet az endometrioma fokozott angiogeneziséért.

Endometriosisos nők peritonealis folyadékában fokozott MIF immunreaktivitás is megfigyelhető, mely különösen az aktív betegség első két stádiumára jellemző (Kats és mtsai, 2002a). Más tanulmányokban nem találtak összefüggést a peritonealis-folyadék MIF tartalma és a betegség stádiuma, illetve az invázió mélysége között (Mahutte és mtsai, 2004).

- Tanulmányunkban infertilitás miatt diagnosztikus laparoscopián átesett nőbetegek peritonealis mosófolyadékának MIF tartalmát és tautomeráz aktivitását vizsgáltuk (Garai és mtsai, 2003).
- Statisztikai vizsgálatot kontroll csoporthoz viszonyított kétmintás *t*-próbával végeztük, melynek során a MIF immunreaktivitását tautomeráz aktivitásával korreláltattuk.

#### A vizsgálatban résztvevő betegek:

A vizsgálatot a Baranya Megyei Kórház, Szülészeti és Nőgyógyászati Osztályának közreműködésével végeztük (Ig. Prof. Dr. Bódis József).

A vizsgált személyek (46) pelvipathiás és/vagy infertilitási panaszokkal jelentkező nők, akiknél a kivizsgálás során az endometriosis diagnózisának verifikálása és stádium beosztása céljából diagnosztikus laparoscopia vált szükségessé. A vizsgálat során 1-2 ml hasüregi folyadékot is nyertünk *in vitro* vizsgálataink céljára.

A tanulmányba 18-40 éves, altatható betegeket vettünk be, akik beleegyeztek a vizsgálatba. Kizártuk azon betegeket, akiknél a laparoscopia elvégzését kizáró/akadályozó állapot állt fenn, illetve a vizsgálat időtartamában bármilyen céllal és jelleggel glükokortikoid, vagy antibiotikus terápiában részesültek.

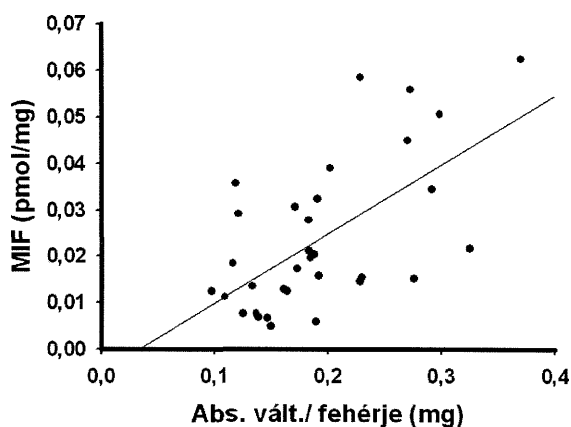
#### Eredmények:

Közlemény: *Frontiers in Bioscience* 11, 595-619, (2006) (Lásd 10.1 fejezet, 5. pont)

Idézhető absztrakt: *FEBS Journal* 272 (s1), D3-014P, (2005) (Lásd 10.2 fejezet, 8. pont)

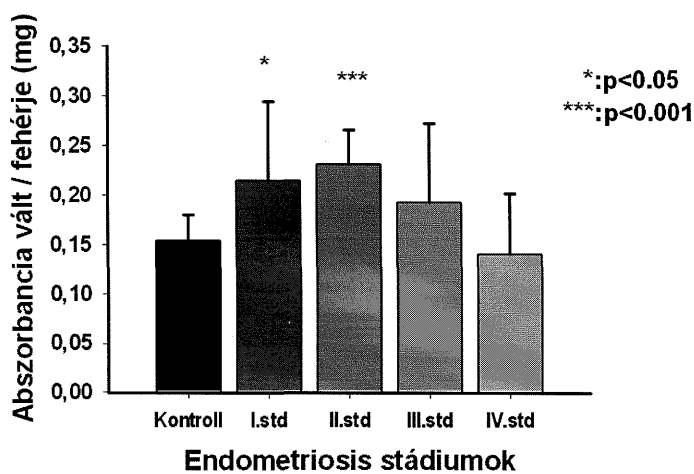
1. A fenilpiruvát keto-enol átalakulása és a MIF immunreaktivitás között nem lehetett korrelációt kimutatni.

2. Ugyanakkor a fenilpiruvát keto-enol átalakulását jelző ún. enoláz reakció és a MIF immunoreaktivitása között egyértelmű korreláció volt tapasztalható.

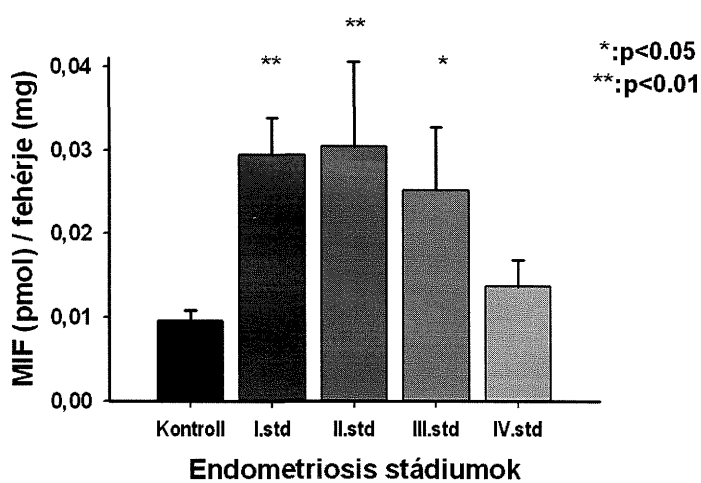


4.6.6. ábra Korreláció a peritonealis folyadék enoláz aktivitása és MIF tartalma között

3. Mind a peritonealis folyadék enoláz aktivitásának mértéke, mind immunoreaktivitása magasabb volt az endometriosis I-es és II-es stádiumaiban összehasonlítva az endometriosis nem rendelkezők mintáival.

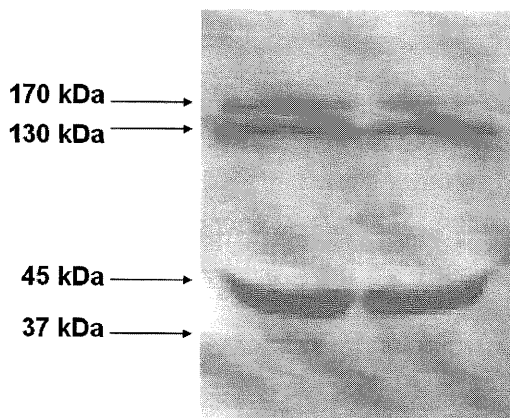


4.6.7. ábra A MIF enoláz aktivitása



4.6.8. ábra Hasmosófolyadék MIF tartalma

4. A peritoneális mosófolyadék enoláz aktivitását a tesztelt MIF inhibitorok hasonlóan gátolták, mint a „gyári” tautomerázt.
5. Az anti-MIF antitesttel végzett Western blot vizsgálat alapvetően a 170, 130, 45 kDa-nak megfelelő molekulásúlynál adott jól detektálható szignált. Ugyanakkor egy haloványabb jel 37 kDa-nál is gyakran észrevehető volt.



**peritoneális folyadékok**

**4.6.9. ábra Western blot hasmosófolyadékból anti-MIF antitesttel**

#### Következtetések:

Mind az ízületi folyadékban, mind a peritoneális mosófolyadékban csak a fenilpiruvát enoláz aktivitás volt értékelhető, melynek mértéke korrelált a MIF ELISA-val mért immunoreaktivitásával. Pedig a thermodynamikailag exergon, tehát a ketonáz reakció zajlik spontán. Így feltételezhetjük, hogy a humán mintákban van valami olyan anyag (feltehetőleg fehérje természetű), mely megakadályozza a spontán reakció lezajlását. Ezt igazolni látszik, hogy egyes minták hígításával a ketonáz reakció „előtűnt”.

Mindkét humán vizsgálatnál a Western blot hasonló módon, 130, 45 kDa-nál is adott jelet, ami azzal magyarázható, hogy a MIF-hez egyéb fehérje is asszociálódott. Ehhez hasonló eredményeket közöltek Vera és munkatársai (2005), akik gyulladáscsökkentő hólyag intralumináris folyadékából, a-MIF antitesttel végzett Western blot vizsgálat során 170, 130 és 12 kDa-nál detektáltak MIF immunoreaktivitást ahol az asszociált fehérjét amit egy  $\alpha$ 2-makroglobulin proteináz inhibitoraként azonosítottak. Megjegyzendő, hogy mind hasmosó, mind ízületi folyadékokból gyakran a trimer MIF-nek megfelelő 37 kDa-os jel is detektálható volt.

### 4.6.3 MIF szérumszintjének változása laparotomián átesett betegekben

#### A probléma háttere:

Állatkísérletekben a MIF növelte az endotoxin okozta mortalitást. MIF ellenes antitestek adását követően azonban a mortalitás csökkenését találták (Bernhagen és mtsai, 1993). Calandra és munkatársai (1994) hipofízis eltávolított egereknél a bakteriális infekcióra létrejövő MIF-termelését elsősorban a makrofágoknak tulajdonították. A makrofágok olyan intracelluláris raktárral rendelkeznek, melyből ez a citokin proinflammatorikus stimulus hatására hasonló módon szabadul fel, mint a hipofízisből. Szintén állatkísérletekben észlelték, hogy bakteriális stimulus hatására 6 órán belül MIF-termelődés indult meg nem csak a hipofízisben, a makrofágokban, hanem a tüdőben, mellékvesében, lépben és a májban is (Meinhardt és mtsai, 1997).

Kritikus állapotú, septicus sokkban lévő betegekben szintén emelkedett MIF-szintet találtak, amely a túlélő csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a nem túlélő csoportban (Beishuizen és mtsai, 2001). Sebészi trauma hatására kialakult stresszreakció emelkedett ACTH- és kortizol-termeléssel jár (Knopp és mtsai, 1999). Gando és munkatársai (2001b) daganat miatt májrezekción átesett betegekben a kortizol szinttel párhuzamos MIF-szekréción emelkedést találtak. Prospektív, leíró klinikai tanulmányunkban a következő kérdésekre kerestünk választ:

- Daganatos betegekben a bélmegnyitás, mint várhatóan jelentős endotoxin felszabadulással járó beavatkozás, mennyire befolyásolja a MIF szérumszintjét a hasonló műtéti inzultussal járó, bélrezekció nélküli beavatkozáshoz képest?
- Amennyiben van különbség a MIF szintek között, az befolyásolja-e a korai posztoperatív morbiditást és mortalitást?

#### Módszerek:

A tanulmányt a PTE ÁOK Anaesthesiológiai és Intenzív Therápiás Intézet (Igazgató: prof. Dr. Bogár Lajos), valamint a Laboratóriumi Medicina Intézet (Igazgató: prof. Dr. Kovács L. Gábor) közreműködésével végeztük.

A Pécsi Orvostudományi és Egészségtudományi Központ Regionális Kutatás-Etikai Bizottság engedélyét követően, vizsgálatunkba 48 beteget vontunk be. Az első csoportba (**A**) azon betegek kerültek, akiknél bélmegnyitás nélkül, májdaganat miatt részleges májrezekció történt (10 beteg), míg a másik csoportba (**B**) olyan betegeket vizsgáltunk, akiknél az operáció során bélmegnyitás történt (18 beteg). A két csoport

között nem volt szignifikáns különbség az életkor, a testsúly és a testmagasság paramétereiben. A nemek közti megoszlás is közel azonos volt. Mindkét csoport kombinált anesztéziában és azonos, antibiotikum-profilaxisban részesült. A két betegcsoport intraoperatív folyadék, valamint transzfúziós terápiájában nem volt érdemi különbség.

Vizsgálatunkból kizártuk azokat a betegeket, akiknél az elektív esetekben szokásos teljes műtéti előkészítés nélkül akut műtétet végeztek, akiknek daganata inoperábilisnak bizonyult, valamint azokat, akiknél az APACHE II. (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) pontrendszer alapján krónikus szervelégtelenség állt fenn.

Műtét előtt ( $t_0$ ), majd azt követően közvetlen utána ( $t_1$ ) illetve a posztoperatív három napig ( $t_2, t_3, t_4$ ) határoztuk meg a MIF,  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-8$ -, prealbumin, albumin, fibrinogén és CRP (C reaktív protein)-szinteket.

Laboratóriumunk csak a szérumban MIF ELISA vizsgálatot végezte. A klinikai paraméterek leírása és a betegek állapotfelmérésére szolgáló score rendszerek terjedelmi okokból sem képezik jelen dolgozat tárgyát.

A statisztikai analízist SPSS for Windows statisztikai program segítségével, Mann-Whitney U és Kolmogorov-Smirnov teszt alkalmazásával végeztük. Szignifikáns eltérésnek a  $p < 0.05$  tekintettük.

### Eredmények:

*Közlemény: Aneszt. Intenzív Ter. 35: 26-33, (2005) (Lásd 10.1 fejezet 4. pont)*

*Idézhető absztrakt: Aneszt. Intenzív Ter. 34:(S.2) 28, (2004) (Lásd 10.2 fejezet, 2. pont)*

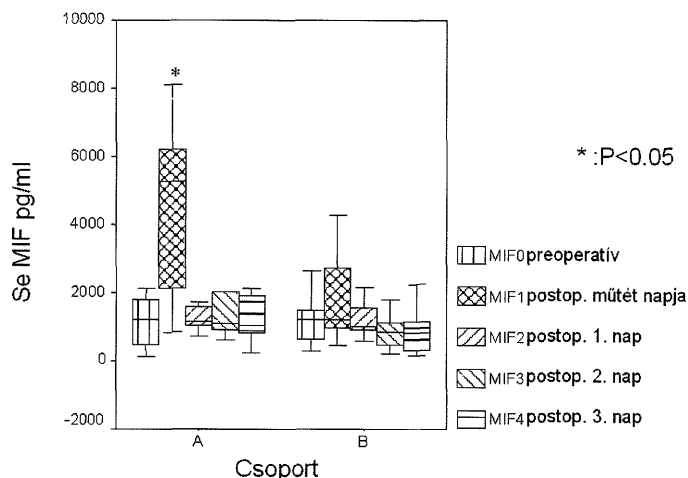
*Idézhető absztrakt: Int. Care Med. 31: (S.1), S114, (2005) (Lásd 10.2 fejezet, 5. pont)*

### **MIF:**

- Mindkét betegcsoport műtét előtti MIF értékét ( $MIF_0$ ) a normál tartományon belül találtuk és nem tapasztaltunk statisztikailag szignifikáns különbséget a két betegpopuláció között.
- Közvetlenül az operáció után mért érték ( $MIF_1$ ) ezzel szemben a májrezekción átesett betegeknél szignifikánsan magasabb volt 4505 pg/ml (1489-7148) mint a másik csoport betegeinél 1774 pg/ml (962-2785).



- A műtétet követő nap mindkét csoportnál ismét normál MIF értéket mértünk, mely nem emelkedett a második és számottevően nem változott a harmadik napon sem.



4.6.10. ábra Szérum MIF szintek változása a műtét előtt és az azt követő napokban

#### Procalcitonin:

- a teljes betegcsoportra nézve az irodalomnak megfelelően emelkedett (Molnár és mtsai, 2000) procalcitonin szintet találtunk az operációt követő napon (PCT<sub>2</sub>) mely a harmadik napig lassú csökkenő tendenciát mutatott (PCT<sub>3</sub>, PCT<sub>4</sub>), de a két csoport között nem volt szignifikáns eltérés.

#### TNF $\alpha$ :

- Az A csoportban, ahol bélmegnyitás nem történt a második napig a TNF $\alpha$ -szint mérsékelt, de fokozatos emelkedését találtuk, majd a harmadik napon csökkent értékeket mértünk.
- A B (bélmegnyitások) csoportban szintén fokozatos emelkedést tapasztaltunk, melynek maximumát az A csoporttal szemben a harmadik napon érte el.
- Az időben egymásnak megfelelő mérések között azonban nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoportnál. Az A csoportban mért magas MIF1-érték és a TNF $\alpha$  szint között szintén nem észleltünk korrelációt.

#### CRP:

- A szérum CRP szint az első 24 órában a fiziológiás tartományban volt (CRP<sub>0</sub>, CRP<sub>1</sub>), majd ezt követően a teljes betegpopulációban a kóros tartományban találtuk (CRP<sub>2</sub>, CRP<sub>3</sub>, CRP<sub>4</sub>). Mindkét csoportnál hasonló kinetikát észleltük.

### **Egyéb paraméterek:**

- Az albumin és a prealbumin fokozatos csökkenését találtuk. A két betegcsoport között nem volt különbség.
- Szintén nem találtunk statisztikailag igazolható különbséget az IL-1 $\beta$ , IL-8 és a mért akutfázis fehérjék, az  $\alpha$ 1-glikoprotein és a fibrinogén-szintek között sem.

### Következtetések:

Gando és munkatársai (2001b) által hepatolobektomiát követően a legmagasabb MIF-értéket 24 óra múlva mérték, és ezt a műtéti stressz okozta hypothalamo-hypophysealis-rendszer aktiválódásával, valamint az endotoxin felszabadulásával magyarázták. Mi ettől eltérően, májrezekciós csoportban közvetlenül a műtétet követően találtunk szignifikánsan magasabb, a normál tartományt meghaladó MIF-szintet, mely a műtétet követő nap ismét a normál tartományba került.

Nem találtunk összefüggést az emelkedett MIF-szint és a korai posztoperatív szövödmények között, és nem volt korreláció a MIF-érték és az általunk mért proinflammatorikus citokinek és akut fázis fehérjék között sem. Mivel klinikai tanulmányok alapján, a procalcitonin szintek emelkedésének egyik legfontosabb stimulusa a bakteriális endotoxin jelenléte, a csoportonként hasonló nagyságú és kinetikájú procalcitonin szint - mivel endotoxin szint mérésére nem volt lehetőségünk – közvetve, hasonló mértékű endotoxin felszabadulásra utalhat (Dandona és mtsai, 2000).

A sebészi stimulus aktiválja a HPA- tengelyt, párhuzamosan emelkedik a plazma ACTH, glükokortikoid valamint a MIF szintje is (Gando és mtsai, 2001b). Az általunk vizsgált két csoport között a műtéti stressz nem tért el számottevően. Tanulmányunkban, egyik betegcsoportban sem észleltük az infekció klinikai jeleit, ezért a műtétet követő, az irodalom által leírt PCT-szint emelkedés oka, feltehetően a műtéti trauma okozta szöveti sérülés lehet (Meisner és mtsai, 1998).

Mivel mindkét betegcsoport tagjai daganatos betegek voltak és műtét előtti MIF-értékük nem különbözött egymástól, ezért a májtumoros betegek magasabb MIF értékét az operáció miatti májsejt károsodással illetve, a sérült májszövetből történő fokozott MIF- felszabadulással magyarázhatjuk (Márton és mtsai, 2004), mely feltételezés igazolására további tanulmányok szükségesek.

## 4.7 A hatékony MIF gátló kávésav hatásainak vizsgálata *in vivo* egér arthritis modellben

### A probléma háttere:

Ismert, hogy ízületi gyulladás során a MIF szerepet játszik a leukocyták toborzásában, aktivációjában proliferációjában és túlélésében; valamint a proinflammatorikus citokinek és mediátorok termelésében; nem utolsósorban a csont- és porckárosodás folyamatában (ld. MIF 1.8.1 fejezet). Bár még nem ismert a MIF tautomeráz aktivitásának szerepe, feltételezhető, hogy annak gátlása hatékonyan csökkenthetné a rheumatoid arthritis tüneteit.

Komplett Freund adjuvánszal (CFA) kiváltott arthritis modellben a szérum és a synoviális sejtek MIF tartalma megemelkedett, továbbá az ízületi folyadékban található makrofágok is nagy mennyiségű citokint szabadítottak fel (Leech és mtsai, 1998).

- CFA állatmodellben teszteltük az *in vitro* erős MIF tautomeráz gátlónak bizonyult kávésav gyulladásgátló hatását, mivel ez az egyik fő hatóanyaga a népi gyógyászatban hagyományosan ízületi gyulladások kezelésére alkalmazott teáknak és főzeteknek.

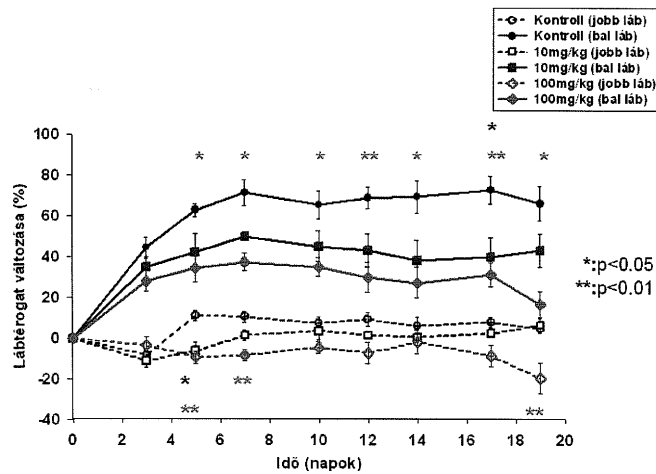
### Módszerek:

- A kísérletek a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetével kollaborációban történtek (Igazgató: prof. Dr. Barthó Lóránd).
- Két állatcsoport 10 mg/kg (n=7), illetve 100 mg/kg (n=7) kávésavat kapott a 21 napos kísérleti időtartam alatt naponta kétszer i.p. (Caffeic acid: Sigma), a kontroll csoportot (n=7) az oldószerrel (10% DMSO, 0,9%-os NaCl oldat) kezeltük. A kísérlet végén az egerek mély altatásban cervikális diszlokációval történő feláldozását követően a tibiotarsalis ízületeket kimetszettük és meghatároztuk belőlük az IL-1 $\beta$  koncentrációját.
- CFA arthritis indukció
- Lábduzzadás mérése
- Mechanonociceptív küszöb mérése
- IL-1 $\beta$  ELISA meghatározása ízületből

- A kávésav lábduzzadásra és allodyniára kifejtett hatásának statisztikai vizsgálatára egyszempontú varianciaanalízist (ANOVA), majd ráépített Bonferroni-féle módosított *t*-próbát használtunk. Az IL-1 $\beta$  koncentráció adatokat Student-féle páratlan *t*-teszttel analizáltuk; \*:p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*:p<0.001.

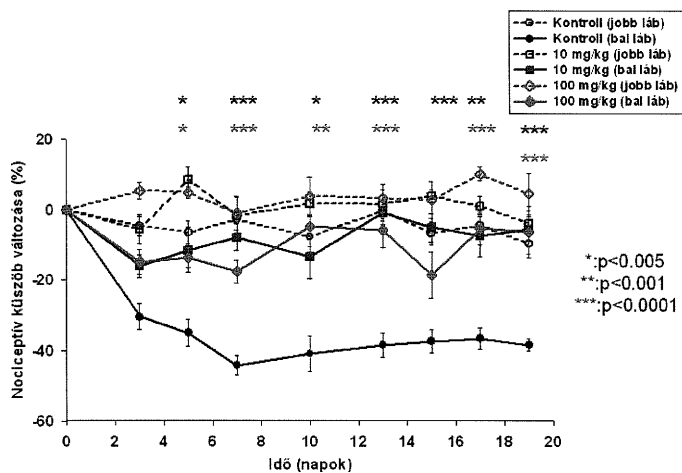
Eredmények:

A CFA-val kiváltott lábduzzadást a kávésav dózis-függő módon szignifikánsan csökkentette mind a kezelt (bal), mind a nem kezelt (jobb) végtagon. Figyelemre méltó, hogy 100 mg/kg dózisban a kávésav a nem kezelt lábon kialakuló enyhébb mértékű ödémát is hatékonyan gátolta.



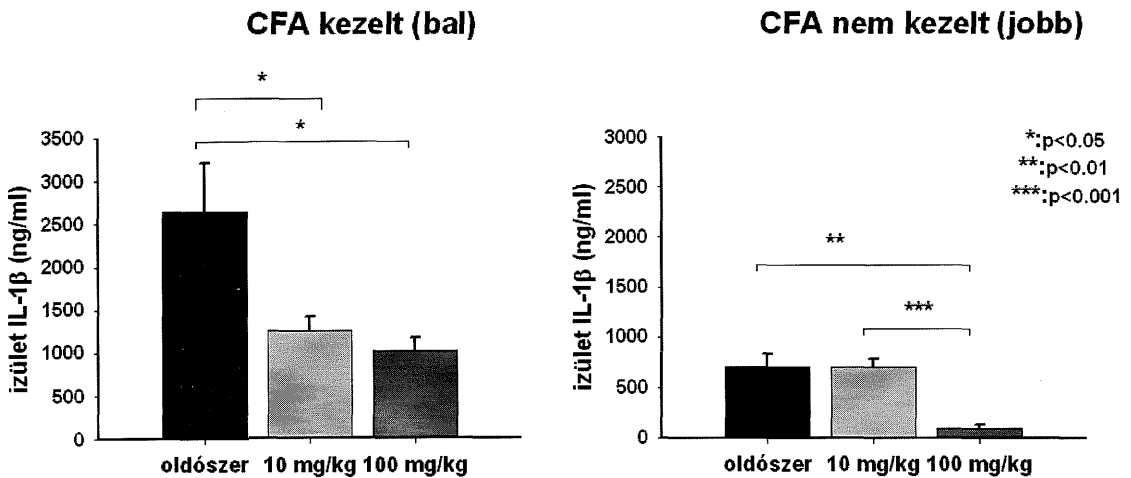
4.7.1. ábra Kávésav kezelés hatása a CFA-val kiváltott lábduzzadásra

A CFA hatására kialakuló gyulladással mechanikai allodyniát a kávésav a CFA-val kezelt lábakon mind 10 mg/kg, mind 100 mg/kg i.p. dózisban szignifikánsan gátolta. Koncentráció-hatás összefüggés néhány napnál ez esetben is megfigyelhető volt.



4.7.2. ábra Kávésav kezelés hatása a CFA-val kiváltott gyulladással mechanikai allodyniára

Ízületi homogenizátumból ELISA vizsgálattal történő IL-1 $\beta$  koncentráció mérés azt mutatja, hogy mind a CFA-val kezelt (bal) lábón, mind az ellenoldali tibiotarsalis ízületben a kávésav csökkentette e gyulladáshoz szükséges citokin termelését. A gátló hatás a bal lábón mindkét, a jobb lábón a 100mg/kg dózissal kezelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva szignifikánsnak bizonyult.



4.7.3. ábra Kávésav kezelés hatása a CFA-val kiváltott IL-1 $\beta$  termelésre az ízületben

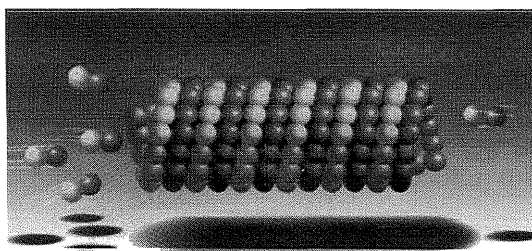
Következtetések:

A MIF tautomeráz aktivitását *in vitro* gátló kávésav *in vivo* CFA-val kiváltott egér arthritis modellben eredményesen csökkentette a lábduzzadást, a gyulladáshoz szükséges mechanikai allodyniát és gyulladáshoz szükséges citokin termelést. Ennek ellenére jelen tájékoztató jellegű kísérletsorozat csupán indirekt bizonyítéka lehet az ízületi gyulladáshoz is részt vevő MIF és annak enzimaktivitását gátló kismolekula kapcsolata között. További szövettani vizsgálatok és citokin mérések folyamatban vannak a gyulladásgátló hatás megerősítésére.

## 4.8 Mikrotubulus funkció és MIF kapcsolatának vizsgálata

### A probléma háttere:

A mikrotubulusok 25 nm átmérőjű csőszerű struktúrák, melyek fontos alkotóelemei a citoszkeletonnak, ami meghatározza a membránnal körülvett sejtalkotók sejtben belüli elhelyezkedését, és irányítja az intracelluláris transzportot (Dustin, 1984), de kulcsszerepet tölt be a sejtosztódásban is (Avila, 1990).



4.8.1. ábra Mikrotubulus

A tubulin fő alegységből épül fel, alfa-, béta- és (egyes esetekben) gamma-tubulin ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -tubulin) (Weisenberg, 1981; Leask és Stearns, 1998; Burns, 1991). Néhány éve írták le a delta ( $\delta$ ) és epsilon ( $\epsilon$ ) tubulint (Chang és Stearns, 2000).

Emlős sejtekben a sejt összes mikrotubulusa általában egyetlen pontból, a mikrotubulus-organizáló központból (MTOC) ered. A mikrotubulus asszociált proteinek (MAP) a citoszkeletális polimerhez kötődő, stabilizáló vagy destabilizáló fehérjék (Cassimeris és mtsai, 1988; Belmont és mtsai, 1990). Emlős agyban a MAP-ok két nagy csoportját különböztethetjük meg. A kb. 300 kDa molekulatömegű MAP1 és MAP2 fehérjéket, valamint az úgynevezett tau proteineket, melyek molekulatömege 53 és 63 kDa. A MAP-ok szerepe a mikrotubulusok képződésének stimulálása és stabilizálása. A mikrotubulusokhoz kötődő MAP-ok szövet- és sejt-specifikusak, és úgy tűnik, hogy a mikrotubulus funkciójától is függenek. Elektronmikroszkóppal látható, hogy a nagy molekulatömegű MAP-ok a mikrotubulusok felszínén, kb. 100 nm hosszú szálatokat képeznek.

A tubulin dimer/polimer arány és a mikrotubulusok sejtben belüli helyzete számos sejtfunció szempontjából fontos: ezek közé tartozik többek közt a sejtek migrációja is. A MIF és a mikrotubulus funkció kapcsolatára számos indirekt bizonyíték utal. A mikrotubulus destabilizációt okozó molekulák, mint a colchicin és a vinblastin,

megakadályozzák a polimerizációt, és élénk, amoeboid típusú sejtmozgást eredményeznek a makrofágokban (Bhisey és Freed, 1971), a hízósejtekben (Padawer, 1966) és a lymphoblastokban (Russel és mtsai, 1968) is. A tengerimalac makrofágok migrációját alacsony koncentrációjú colchicin vagy vinblastin kezelés jelentősen fokozta (Pick és Abrahamer, 1973; Cheung és mtsai, 1978; Crispe, 1976). Mind a colchicin, mind a vinblastin megakadályozza a MIF migráció gátló hatását (Pick és Abrahamer, 1973; McCarthy és mtsai, 1979). 16 órás MIF expozíció ugyan nem változtatta meg a makrofágok ösztubulin mennyiségét, de a polimerizált forma kontrollhoz viszonyítva 150-200 %-os emelkedést mutatott (Pick és mtsai, 1979). Mivel a sejtmozgás gátlása a polimerizált tubulin arányának emelkedésével jár együtt, feltehető, hogy intakt mikrotubulus funkció szükséges ahhoz, hogy a MIF kifejtse a migráció gátló hatását.

A mikrotubulus funkció és MIF kapcsolatára utal továbbá, hogy Alzheimer kórban a senilis plakkok amyloid  $\beta$ -proteinjéhez ( $A\beta$ ) számos fehérje képes aggregálódni, mint pl. glutamin szintáz, haemoglobin  $\alpha$ -lánc, gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz, albumin, tau protein, MIF és nem utolsósorban  $\beta$ -tubulin (Oyama és mtsai, 2000). Alzheimeres agyban a MIF  $A\beta$ -hoz való kapcsolódásának kórélettani jelentőséget tulajdonítanak (Oyama és mtsai, 2000) a plakk képzésben és/vagy lerakódásban. Negatív festéssel elektronmikroszkóp segítségével kimutatták, hogy az agyban expresszált MIF a beta-amyloidhoz és az alfa-synucleinhez hasonlóan, savas környezetben, képes amyloid fibrillumokat képezni (Lashuel és mtsai, 2005). A MIF aggregációs és amyloid képző képessége pH 2-3 között a legnagyobb. pH 6-8 között, 11 nm átmérőjű, hosszú filamentumokat képez; ezzel szemben, pH 4-5 között, MIF hatására rövid, protofibrillum szerű struktúrák dominálnak. Az egyik leghatásosabbnak talált MIF tautomeráz gátló, a kurkumin (Molnár és Garai, 2005) Alzheimer kórban képes csökkenteni az amyloid és plakk képződést (Lim és mtsai, 2001).

Patkány agyban a cortex, a hypothalamus, a hippocampus, a cerebellum és a híd neuronjaiban figyeltek meg MIF expressziót. Továbbá a gyrus dentatus moharostjaiban és a hippocampus CA3 zónájának dendritjeiben volt kifejezett immunreaktivitás (Bacher és mtsai, 1998).

A ciszternába adott proinflammatorikus stimulus (LPS injekció) hatására a neuronális MIF mRNS és fehérje expresszió megemelkedik (Bacher és mtsai, 1998). Tehát az agyban nem csak konstitutív, hanem indukálható MIF termelés is jelen van,

azonban a MIF agyi funkciója jelenleg nem ismert. Feltételezik, hogy tautomeráz aktivitása az oxidált catecholaminok detoxifikálásában játszhat szerepet (Matsunaga és mtsai, 1999a). Ezzel szemben figyelemre méltó, hogy MIF hiányos egérben nem észleltek súlyos idegrendszeri károsodást (Bozza és mtsai, 1999; Fingerle-Rowson és mtsai, 2003).

- Sertés agyban vizsgáltuk az alábbiakat:

1. Kimutatható-e MIF immunoreaktivitás a sertés agyból izolált tubulin preparátumban kvalitatív (immunoblot) és kvantitatív (ELISA) vizsgálattal?
2. Befolyásolja-e a MIF immunoreaktivitás mértékét a több cikluson keresztül zajló tubulin tisztítási folyamat?
3. Rendelkezik-e kimutatható enzimaktivitással az egy ciklusban izolált, nagy MAP tartalmú tubulin?
4. Változik-e ez az enzimaktivitás a tisztítási ciklusok számának emelésével?
5. Hogyan változik az egységnyi fehérjére eső MIF mennyiség a tisztítási ciklusok után?
6. A MIF leghatásosabb inhibitorai hogyan befolyásolják a nagy MAP tartalmú tubulin tautomeráz enzimaktivitását?
7. Változik-e a tubulin preparátum polimerizációja a tautomeráz enzimreakciót legerősebben gátló kismolekulák alkalmazásakor?
8. Megtalálható-e MIF a sertés agykéregben, és ha igen, mely idegrendszeri sejtek tartalmazzák?
9. Kimutatható-e morfológiai módszerrel a MIF tubulin kapcsolat?

#### Módszerek:

- Tubulin izolálás: egy ciklusban, illetve a mikrotubulus asszociált fehérjék és egyéb szennyeződések elkerülésére 3 cikluson keresztül
- HM- tubulin (high molar) tisztítási módszerrel még nagyobb tisztaságú tubulint kaptunk
- Ezüstözéssel: a tisztítás eredményességét vizsgáltuk.
- Western blottal: ellenőriztük a tubulin preparátumunkban jelenlevő: MIF-et nyúlban termeltetett anti-ratMIF (1:2.000), nyúl anti-ratMIF IgG (1:20.000), és tubulint nyúl anti- $\alpha$ Tubulin H-300 (1:200).
- ELISA-val detektáltuk a preparátumban levő MIF mennyiségét.



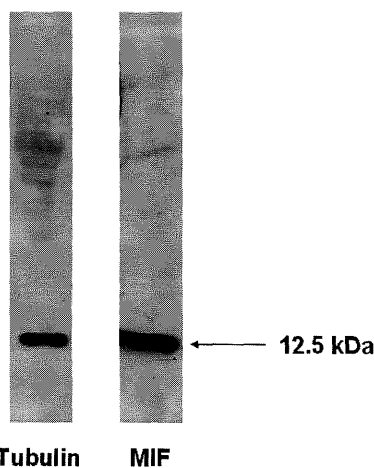
- Enzimaktivitás méréseket a marhaveséből izolált tautomeráz ketonáz és enoláz aktivitás mérések alapján végeztük, azzal a különbséggel, hogy itt az enzim helyett 60µl tubulin preparátumot adtunk a mérendő küvettába. A tubulin enzimaktivitására a Sigma tautomeráz leghatékonyabb gátlóit teszteltük.
- A tubulin polimerizációját: az enzimaktivitásában leghatékonyabb gátlást elért kismolekulákkal is befolyásoltuk
- A szövettani vizsgálatokat: a PTE ÁOK Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumában végeztük Prof. Dr. Seress László és Dr. Ábrahám Hajnalka irányításával.
  - Fénymikroszkópos immunhisztokémia:
    - Fénymikroszkópos immunhisztokémia paraffinos metszeteken
    - Fénymikroszkópos immunhisztokémia úsztatott metszeteken
  - Elektronmikroszkópos immunhisztokémia

Eredmények:

*Konferencia: Magyar Élettani Társaság LXIX. Vándorgyűlése, Poszter (Lásd 10.3.2 fejezet 10. pont)*

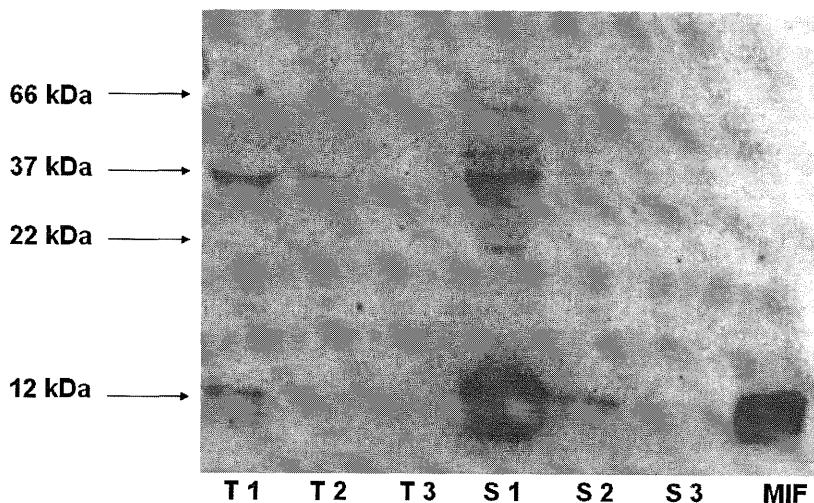
*Kézirat - a teljes MIF-tubulin anyagból - előkészítés alatt (Lásd 10.1 fejezet 7. pont)*

1. A tubulin preparátumunkban mind anti-MIF antitesttel történt Western blot analízissel, mind kvantitatív (ELISA) vizsgálattal kimutatható a MIF jelenléte. Western blot során a monomer MIF-nek megfelelő helyen, 12,5 kDa molekulatömegnél detektálható egy immunoreaktív sáv. ELISA vizsgálattal  $358 \pm 17$  pg/ml MIF tartalmat mértünk



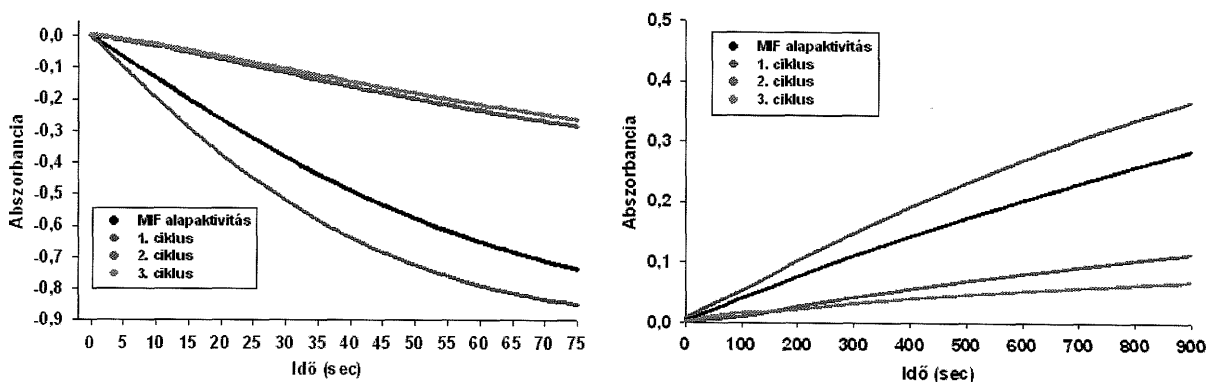
**4.8.2 ábra A tubulin preparátum Western blot analízise anti-MIF antitesttel**

2. A három ciklus tubulin és felülúszó WB analízise jól mutatja, hogy az a-MIF-immunoreaktivitás mind a tubulinban, mind a felülúszóban csökken, olyannyira, hogy a 3. ciklusban jól kivehető sáv már nem látszik.



4.8.3 ábra Három ciklus tubulin (T) és felülúszó (S) Western Blotja anti-MIF antitesttel

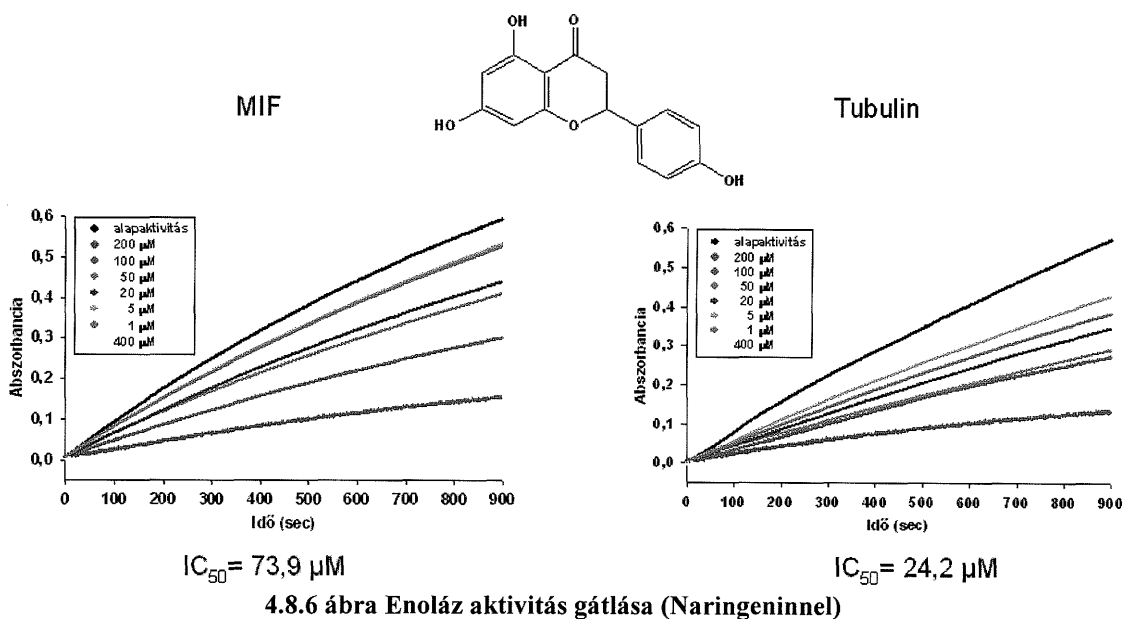
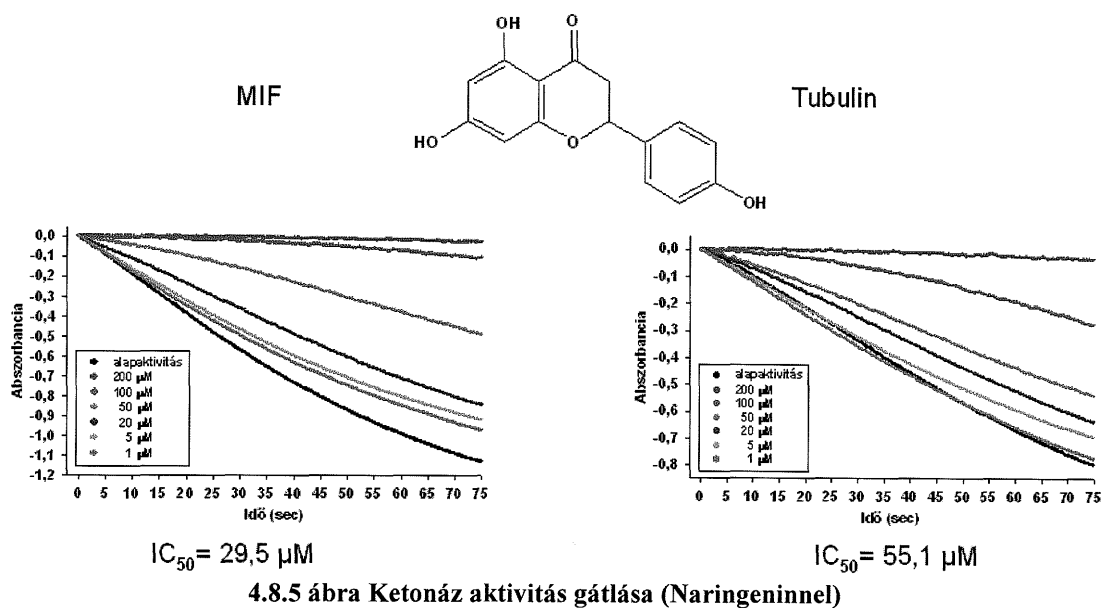
3. Nagy MAP tartalmú tubulin preparátumunkban a MIF tautomeráznak megfelelően, mindkét irányban detektáltunk enzimaktivitást.
4. Az egyes tubulin preparátumok ketonáz és enoláz enzimaktivitása a ciklus számának emelkedésével arányosan csökken. A tubulinnal párhuzamosan vizsgáltuk a felülúszók enzimaktivitásait is, mely jóval nagyobb mértékű volt, de az elsőtől a harmadik ciklusig az is fokozatosan csökkent.



4.8.4 ábra Tubulin preparátumok ketonáz és enoláz aktivitása

5. Bradford és ELISA vizsgálat segítségével meghatároztuk az egységnyi fehérjére eső MIF mennyiséget, mely a Western blot denzitásnak és az enzimaktivitás mértékének megfelelően legmagasabb az első ciklusban (0,0226 pmol/mg fehérje), és legalacsonyabb a harmadik ciklusban (0,0083 pmol/mg fehérje) volt.

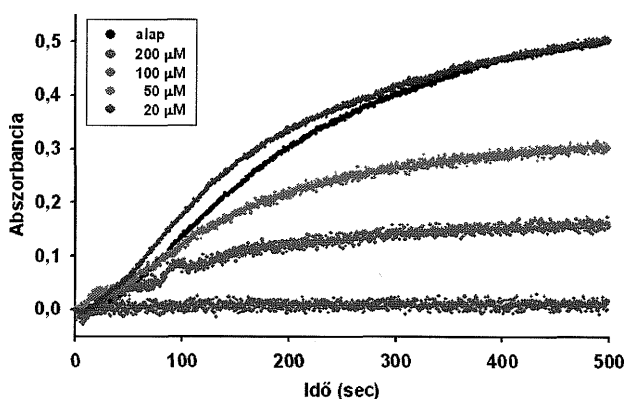
6. A vizsgált kismolekulák nemcsak a MIF, hanem a tubulin preparátum fenilpiruvát tautomeráz ketonáz és enoláz reakcióját is koncentrációfüggő módon gátolták.



A MIF és a tubulin fenilpiruvát tautomerázon nyert  $IC_{50}$  értékek korrelálnak egymással, ugyanakkor a mért molekulák a tubulin enzimaktivitását csak magasabb koncentrációkban gátolják. A tubulin preparátum ketonáz reakciója során a legerősebb gátló aktivitással a morin ( $IC_{50}=9,68 \mu M$ ) és a floretin ( $IC_{50}=20,59 \mu M$ ) rendelkezett. Az enoláz reakció vizsgálata során, a legjobb gátló molekula a kávésav ( $IC_{50}=11,47 \mu M$ ) és a naringenin ( $IC_{50}= 24,22 \mu M$ )

volt. Az acetaminophen - a többi vizsgált molekulával ellentétben - a tubulin tautomeráz aktivitását csak jóval nagyobb koncentrációban gátolta ( $IC_{50}=103,34 \mu\text{M}$ ), míg MIF tautomeráz esetében  $IC_{50}$  értéke kifejezetten alacsony volt ( $IC_{50}=1,01 \mu\text{M}$ ).

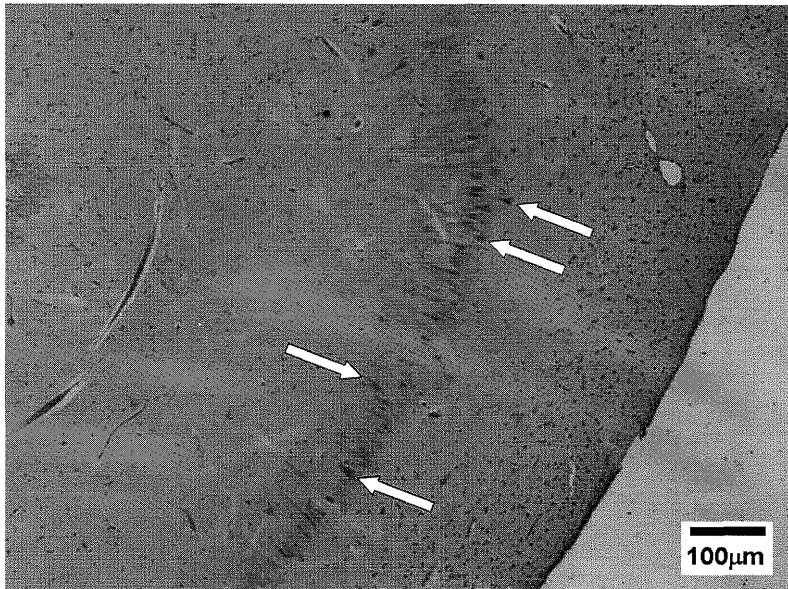
7. A tubulin polimerizációját legerősebben a rozmaringsav és a naringenin gátolta, melyet a morin követett.



4.8.7 ábra A naringenin hatása a tubulin polimerizációra

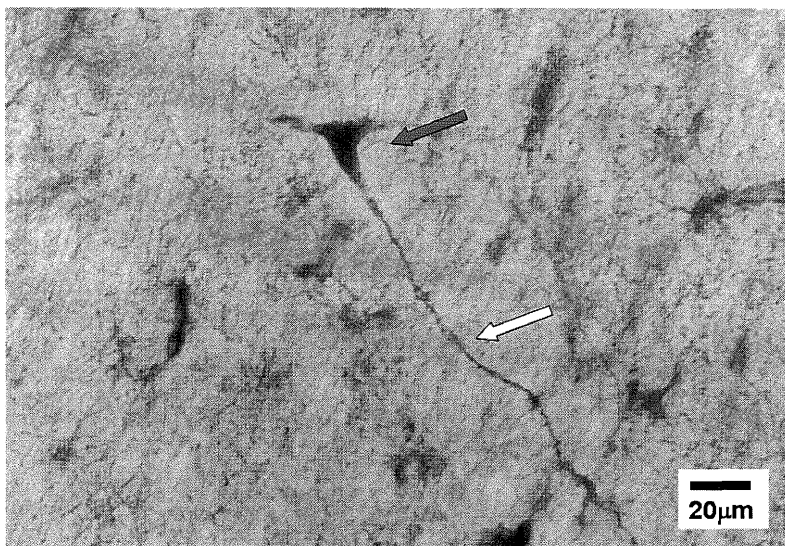
Hasonlóan erős polimerizáció gátlást eredményezett az ellaginsav (ellagic acid), a floretin és az umbelliferon. A tubulin polimerizációt a vizsgált növényi hatóanyagok nem, de az acetaminophen serkentette. Az enzimaktivitás szempontjából leghatékonyabbnak bizonyuló kávésav ugyanakkor nem befolyásolta a tubulin polimerizációját. Lásd 4.8.1. táblázat.

8. Immunhisztokémiai vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a MIF az agykéregben neuronokban expresszálódik. A hippocampus és a parahippocampalis kéreg területén (a subiculumban) a MIF-immunreaktivitást főként piramissejtekben figyeltük meg.



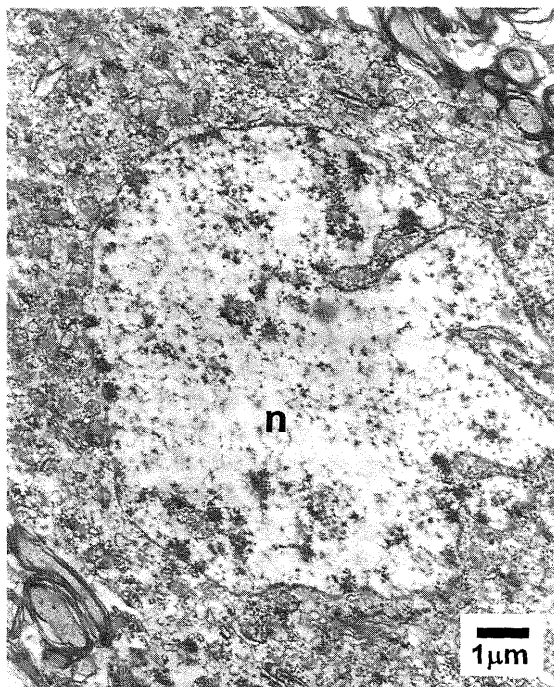
4.8.8. ábra Fénymikroszkópos felvétel, ami MIF-immunpozitív piramissejteket (nyilak) mutat az Ammon szarv (hippocampus) piramissejt rétegében.

Ezen kívül a temporális neocortexben, főként az alsó rétegekben a MIF pozitivitás néhány gátló sejtben is jelen van.

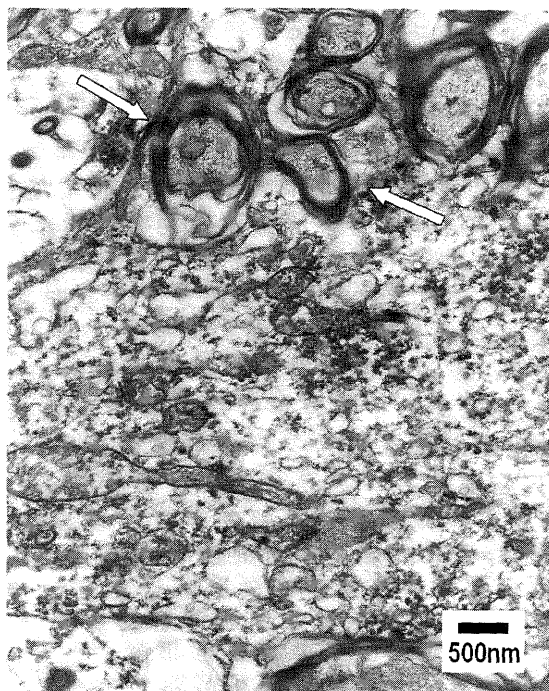


4.8.9. ábra MIF-immunreaktív agykérgi gátló idegsejt fénymikroszkópos képe. A piros nyíl a sejttestre mutat, a fehér nyíl a sejt egyik dendritjét jelzi.

9. A MIF-immunreaktív sejtek elektronmikroszkópos vizsgálatával kimutattuk, hogy a sejtek valóban idegsejtek.

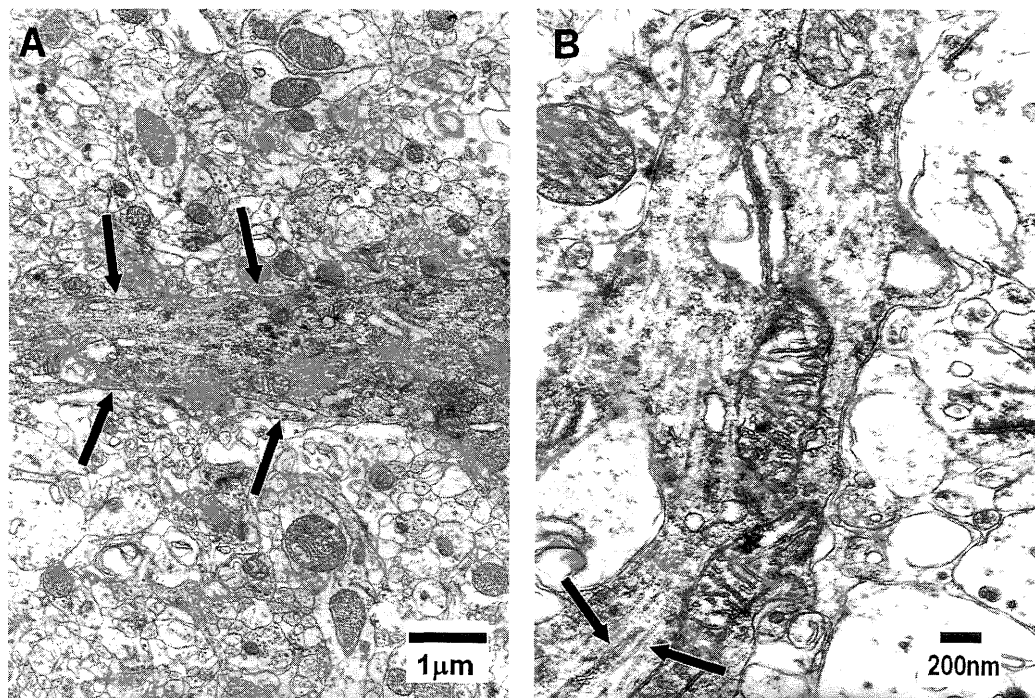


4.8.10. ábra Egy MIF-immunopozitív idegsejt sejttestjének elektronmikroszkópos képe. Az n jelzés a sejtmagot jelzi.



4.8.11. ábra Egy MIF-immunjelölt idegsejt sejttestjének elektronmikroszkópos képe. A nyíllal jelzett keresztmetszetek a sejt szomszédságában megfigyelhető myelinizált axonokra mutatnak.

A MIF immunpozitivitás az idegsejtek nagy mennyiségű párhuzamos mikrotubulust tartalmazó dendritjeiben és axonjaiban kifejezett volt.



4.8.12 MIF-immunreaktív idegsejtek dendritjének elektronmikroszkópos képe. A nyilak a dendritre (A), mikrotubulusokra (B) mutatnak.

### Következtetések

A tubulin preparátumban kimutatható MIF felveti annak lehetőségét, hogy a MIF fehérje lenne felelős a preparátumban megfigyelt fenilpiruvát tautomeráz aktivitásért. Ezt támasztja alá a több cikluson keresztül vitt tubulin tisztítási módszerrel a harmadik ciklus után mérhető enzimaktivitás csekély mértéke, ami jól korrelál az ELISA-val detektálható minimális MIF mennyiséggel.

A vizsgált növényi eredetű gyulladásgátló kismolekulák koncentrációfüggően gátolták mind a MIF, mind a tubulin preparátum fenilpiruvát tautomeráz aktivitását. A nagy MAP tartalmú tubulin preparátumban MIF fehérje jelenlétét igazoltuk, melynek enzimaktivitását, a vizsgált anyagok koncentrációfüggő módon, hatékonyan befolyásolták. A polimerizáció tekintetében a vizsgált anyagok hatása elérő. Mivel nem rendelkezünk még megközelítő ismerettel sem arról, hogy maga a MIF tautomeráz egész pontosan milyen szerepet tölthet be a tubulin polimerizáció folyamatában, az aktivitását különbözőképpen gátló molekuláknak erre a jelenségre gyakorolt hatását analizálni jelen pillanatban meglehetősen elhamarkodott lépés lenne. Már csak azért is, mert nem találtunk direkt összefüggést a molekulák megfigyelt fenilpiruvát tautomeráz

enzimaktivitást gátló hatáserőssége és a tubulin polimerizációt befolyásoló képessége között.

Eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy az intracellulárisan található MIF citokin MAP-ként is funkcionálhat, valamint azt, hogy a vizsgált kismolekulák gyulladásgátló hatásában szerepet játszhat azon képességük, hogy befolyásolják a MIF citokin enzimaktivitását és a tubulin polimerizációját.

Fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos vizsgálataink megerősítik a biokémiai vizsgálataink eredményeit, miszerint a MIF és a mikrotubulusok funkcionális egységet alkothatnak.

A MIF immunreaktivitás lokalizáció és funkció szempontjából eltérő (serkentő és gátló) idegsejtcsoportokban való megjelenésére jelenleg nincsen meggyőző magyarázatunk. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a MIF-hez hasonlóan más fehérjék esetében is megfigyelhető hasonló jelenség. Példa erre a kalcium kötő fehérje, a calbindin, amely az agykéreg különböző területein mind piramissejtek, mind pedig interneuronok egyes csoportjaiban expresszálódik, melynek, a kalciumkötő képességen kívül mind máig ismeretlen a funkcionális jelentősége (Baimbridge és mtsai, 1992).



## 4.9 Postmenopausalis osteoporosis prevenciója növényi ösztrogénekkal

A postmenopausalis osteoporosis ugyan nem kapcsolódik szorosan a MIF szintjének, enzimatis aktivitásához és gátlásához, mely dolgozatom fő témáját adja, ennek ellenére szeretném diákkörös koromban elkezdett munkám részleteit is jelen dolgozatban tárgyalni. Melynek magyarázata, hogy a szakirodalom szerint a MIF és az ösztrogének hatásmechanizmusa között összefüggések találhatók, pl. az osteoporosis tekintetében is (Shigeki és mtsai, 2006). Az osteoporosis prevenciójában alkalmazható növényi ösztrogének nem elhanyagolható hatást mutattak saját méréseink szerint a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitására.

### A probléma háttere:

A postmenopausalis osteoporosis a fejlett országok idősödő nőpopulációjának egyik legjelentősebb egészségügyi problémája. A menopausa után kialakult ösztrogénhiány következtében fokozódik a csont-turnover, mely csontfelszívódáshoz és fokozott törési kockázathoz vezet (NIH Consensus, 2001).

Kísérleti állatokban a petefészek eltávolítás útján létrehozott osteoporosis, elismert modellje a postmenopausalis csonttrikulásnak. A MIF szerepét az osteoporosisban vad típusú és ovariectomizált (OVX), valamint MIF (-/-) egereken vizsgálták (Shigeki és mtsai, 2006). Eredményeik szerint a MIF (-/-) egerekben elmaradt az osteoclastok aktivitásának fokozódása, ugyanakkor a vad típusban a szérum MIF szignifikáns emelkedést mutatott az ovariectomiát követő 24. órában. De a 7. napon az áloperált és az OVX csoport között eltérés már nem volt kimutatható. Úgy tűnik tehát, hogy a MIF szükséges az ösztrogénhiány miatt kialakult csontvesztéshez. Néhány *in vitro* és *in vivo* tanulmány szerint a MIF képes az immunsejtek TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 és NO termelését befolyásolni (Calandra és mtsai, 1994; Bernhagen és mtsai, 1994; Leech és mtsai, 1999; Morand és mtsai, 2003; Morand és Leech, 2005). Mivel a MIF a citokinek termelését fokozza (Baugh és Donnelly, 2003) felvethető, hogy az ovariectomiát követő csont resorptiót okozó mediátorok aktiválása, részben a szérum MIF szint gyors megemelkedésének tulajdonítható.

A postmenopausalis osteoporosisist jelenleg vagy hormonpótló kezeléssel, vagy alternatív módszerekkel próbálják megelőzni. A hormonpótló kezelések mellékhatásai

miatt a menopauzás populáció körében egyre nagyobb teret hódítanak a különféle növényekből származó, ösztrogén hatással rendelkező vegyületek.

Számos irodalmi adat utal a fitoösztrogének jótékony szerepére. Ezen jótékony hatások megnyilvánulnak a postmenopausalis osteoporosis lassításában, mert képesek fenntartani a csontsűrűséget (bone mineral density, BMD) (Dalais és mtsai, 1998; Kardinaal és mtsai, 1998; Alekel és mtsai, 2000; Ho és mtsai, 2001; Mei és mtsai, 2001; Chiechi és mtsai, 2002; Kim és mtsai, 2002; Morabito és mtsai, 2002). Ugyanakkor a szív-érrendszerre is jótékony hatással vannak, hiszen a szójából illetve a lenmagból származó izoflavonoidok képesek csökkenteni a szérum teljes koleszterin szintjét (Potter és mtsai, 1998; Crouse és mtsai, 1999; Washburn és mtsai, 1999; Merz- Demlow és mtsai, 2000; Jayagopal és mtsai, 2002; Lucas és mtsai, 2002), az LDL koleszterolt (Potter és mtsai, 1998; Merz-Demlow és mtsai, 2000; Teede és mtsai, 2001; Wangen és mtsai, 2001; Jayagopal és mtsai, 2002; Lemay és mtsai, 2002; Lucas és mtsai, 2002) és emelni a HDL szintjét (Potter és mtsai, 1998; Sanders és mtsai, 2002). A csont és zsírsavcserén kívül a fitoösztrogéneknek hatása lehet a daganatok gyakoriságának csökkentésére is. Kimutatták, hogy ha magas a plazma enterolakton koncentrációja, ritkább az emlőrákok előfordulása (Pietinen és mtsai, 2001; Boccardo és mtsai, 2004). Hasonló összefüggést találtak az izoflavonoid és lignánbevitel, valamint a pajzsmirigy (Horn-Ross és mtsai, 2002), petefészek (McCann és mtsai, 2003), és emlőrákok (Lee és mtsai, 1991; McCann és mtsai, 2002) között is.

A növényi ösztrogének az endogén szteroid ösztrogénekhez némelyest hasonló szerkezetű vegyületek. A legnagyobb ösztrogenitással rendelkező equol szerkezetét összehasonlítva az ösztradioléval a két disztális -OH csoport távolsága majdnem megegyezik (Kenneth és mtsai, 1999). *In vitro* az ösztrogénhez hasonlóan, de annál jóval gyengébben kötődnek az ösztrogén alfa receptorához (ER- $\alpha$ ), de ennél erősebben a béta-receptorhoz (ER- $\beta$ ) (Kuiper és mtsai, 1996). *In vivo* állatkísérletekben az ösztrogénhez hasonlóan az uterus súlynövekedését idézik elő, azonban csak a százezerszeres genistein ill. százharmincezerszeres daidzein mennyiség képes az egységnyi dietilstilbösztrol (DES: szintetikus ösztrogén) uterotrop hatását létrehozni (Reinli és Block, 1996). Ebből az következik, hogy e valódi ösztrogénhatást kiváltó, nagyon magas fitoösztrogén vérszinteket humánban diétás úton gyakorlatilag nem lehet elérnünk. Különösen, ha figyelembe vesszük azt a tényt is, hogy az élelmiszerek izoflavon tartalma a feldolgozás során jelentősen csökken. Ez legszembetűnőbb a szója esetében, ahol a teljes szójabab tekintélyes genistein és daidzein tartalmához képest a

szójaburgerben ugyanezen fitoösztrogének csak elenyésző mennyiségben mutathatók ki (Murphy, 1982).

- Intervenciós tanulmányunkban menopauzás populációban a fitoösztrogének és a célzott mozgásprogram osteoporosis prevencióra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A diétás intervenciót egy szabadalommal védett speciális magas sütemény jelentette, mely 32% teljes szóját és 23% lenmagot tartalmazott, ugyanakkor textúrájában, ízvilágában kielégíti a hagyományos európai ízlést.

### Módszerek

- A tanulmányban használt péktermék reggel és este 2 egyenlő adagra elosztva, biztosította a 60-80 mg szója izoflavonoid és 200 mg lenmag eredetű lignán mennyiség napi bevitelét. Az extrém magas magtartalmú péktermékekből a programba önként jelentkező változókorban levő hölgyeknek egy éven keresztül napi 10-12 dkg-t kell elfogyasztaniuk.
- A programba való beválasztás feltétele volt a minimum fél éves menopausalis amenorrhoea. Belgyógyászati betegségek közül nem volt kizáró ok a megfelelően beállított hypertensio. Kizárási kritérium volt viszont a kóros mértékű osteoporosis, hiszen manifeszt csonttrikulásban szenvedőkön nem a prevenció, hanem csak a megfelelő terápia segíthet.
- A negyedévenkénti vérvétel kapcsán ötféle fitoösztrogén vérszintjét monitoroztuk TR-FIA DELFIA (Time Resolved Fluoroimmunoassay, Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay) módszerrel. Vizsgáltuk a szójában nagy mennyiségben előforduló genisteint és daidzeint, valamint ez utóbbi metabolitját: az equol és az o-desmethyl-angolensint (O-DMA), továbbá a lenmagban, (rozsbán, eperben, stb.) megtalálható lignánok metabolitját az enterolaktont.
- A csontsűrűséget DEXA (Dual-Energy X-Ray Absorptiometry) vizsgálattal a PTE ÁOK Központi Klinikai Radioizotóp Laboratóriumában mérték.
- Krónikus vizsgálatnál különösen fontos a TSH monitorozása, mivel a flavonoidok egy része állatkísérletekben a thyroid peroxidáz gátlása miatt antithyroid hatást mutat, azaz hypothyreosist képes kiváltani (Divi, 1997). Ezért negyedévente ellenőriztük a pajzsmirigy-funkciót is.

## Eredmények

Idézhető absztrakt: „Soy & Health 2004”-Clinical Evidence, Dietetic Applications: Eds: Koen Descheemaeker & Ignace Debruyne 186-187, (2005) (Lásd 10.2 fejezet, 6. p)

Idézhető absztrakt: Osteoporos Int. 17 (s2): S19–S231 (P508SA) (2006) (Lásd 10.2 fejezet, 9. pont)

A 121 önként jelentkezőből, a feltételeknek megfelelt 72 nő közül, végül 56 fejezte be az egy éves intervenciós periódust.

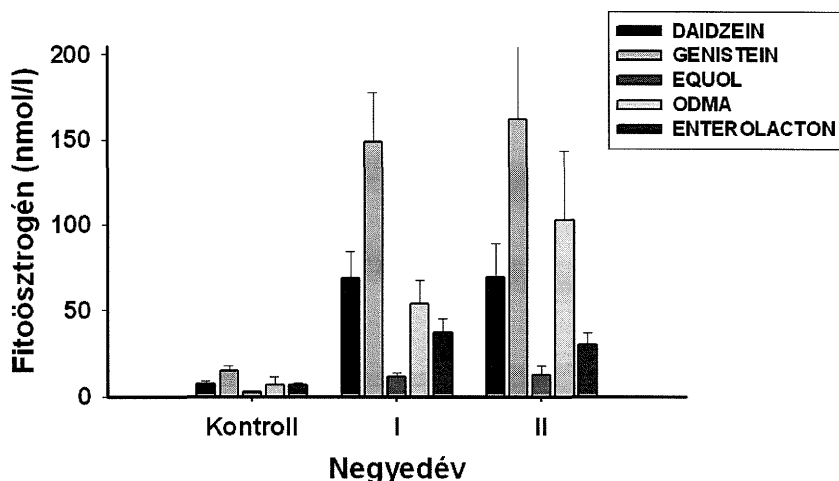
A résztvevők összetétele (közéérték  $\pm$ SD):

- Életkor:  $53,11 \pm 4,8$
- Magasság:  $1,66 \pm 0,08$  cm
- Testtömeg:  $71,6 \pm 9,1$  kg
- BMI:  $25,98 \pm 2,7$
- Utolsó menstruáció éve:  $49,62 \pm 2,5$

Csoportbeosztás:

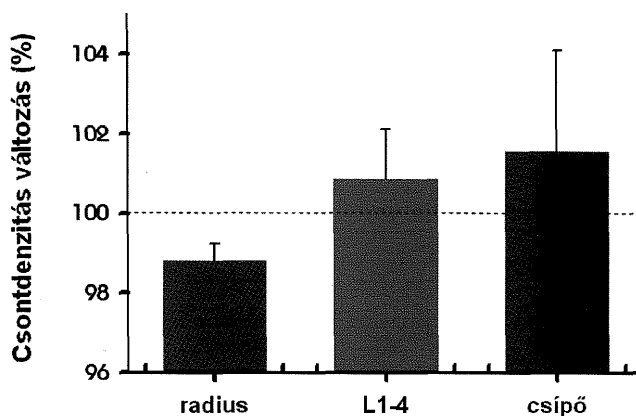
1. Kontrol csoport (intervenció nélkül): 21 fő
2. Fitoösztrogén sütemény (Keksz) (120g/nap; 32% szója és 20% lenmag): 15 fő
3. Torna (heti 3x1 óra, ebből 1 óra szakgyógytornász felügyeletével): 6 fő
4. Keksz és torna együtt: 14 fő

1. A résztvevők kiindulási, kontroll fitoösztrogén vérszintje a várakozásoknak megfelelően alacsony értékeket mutatott. A fitoösztrogén szinteket már negyedéves süteményfogyasztás is jelentősen megemelte.



4.9.1. ábra Szérum fitoösztrogén szintek az első két negyedévben

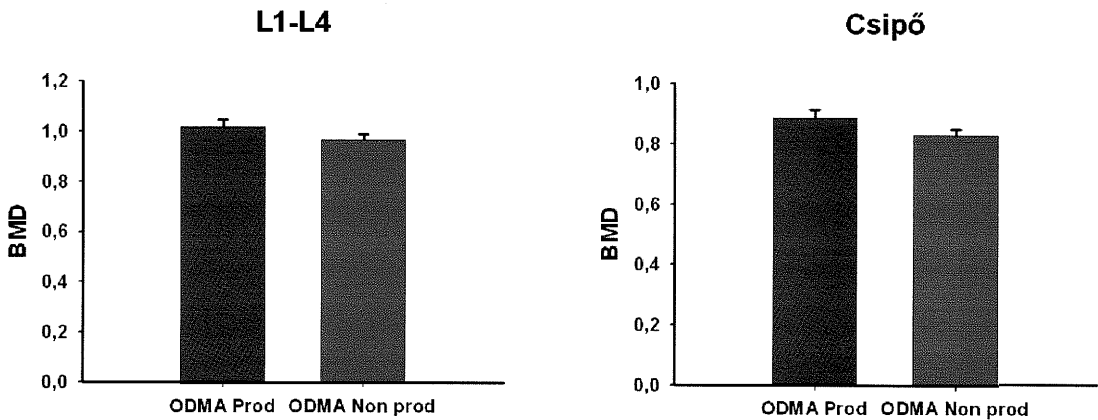
2. Az ösztrogenitás szempontjából legpotensebb equol szintje is többszörösére növekedett. Figyelemreméltó, hogy az azonos fitoösztrogén tartalmú, azonos mennyiségű sütemény elfogyasztása után, nagymértékű egyéni eltéréseket találtunk a plazmaszintekben. Különösen érvényes ez az equol és az ODMA metabolitokra, melynek háttérében az egyéni gastrointestinalis metabolizmus áll. Ennek megfelelően a populáció ~80-90%-a képes ODMA-t termelni, azaz ODMA producerek (Kelly és mtsai, 1995; Arai és mtsai, 2000). Ugyanakkor a populáció ~33-50%-ában magasabb a leghatékonyabb fitoösztrogén (equol) szintje, ők az úgynevezett equol producerek (Rowland és mtsai, 2000; Lample és mtsai, 2001; Setchell és mtsai, 2002).
3. Csontsűrűség szempontjából vizsgálva az egyes csoportokat a fitoösztrogén intervenció egy év alatt ugyan nem hozott szignifikáns javulást, de már az is eredménynek számíthat, hogy a menopauzális populációban nem csökkentek tovább a BMD értékek.
4. Külön értékelve az equol producerek csontsűrűség változását látható, hogy a csípőn és a lumbális szakaszon javulás tapasztalható.



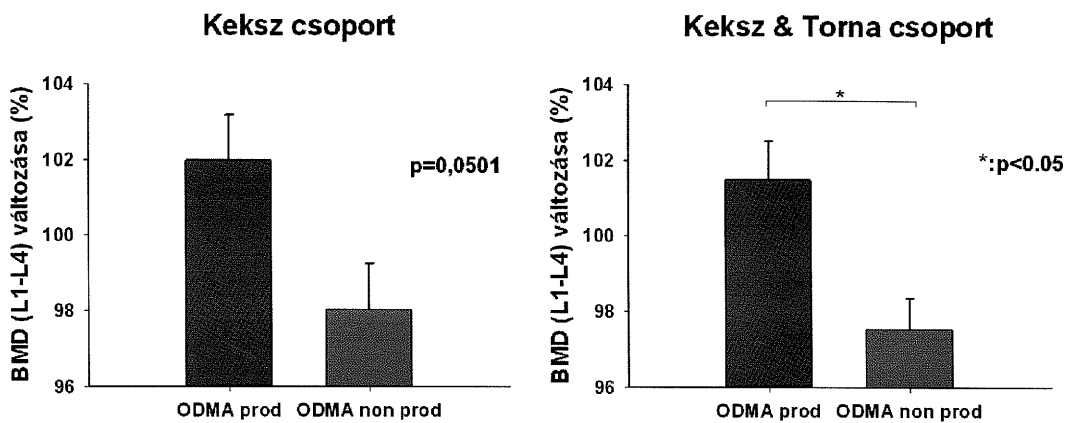
4.9.2. ábra Az equol producer (>5 nM/l) csontsűrűség változása

5. Az ODMA producerek esetében a fitoösztrogén sütemény fogyasztása okozta változás az egyes csoportok között is szembetűnő. Míg az ODMA producer és non producer populáció kiindulási totál BMD szintje mind a lumbális, mind a csípő területén közel azonos volt. A lumbális szakaszon a keksz fogyasztása tornával kombinálva szignifikáns mértékben ( $p < 0.05$ ) akadályozta meg az ODMA producer

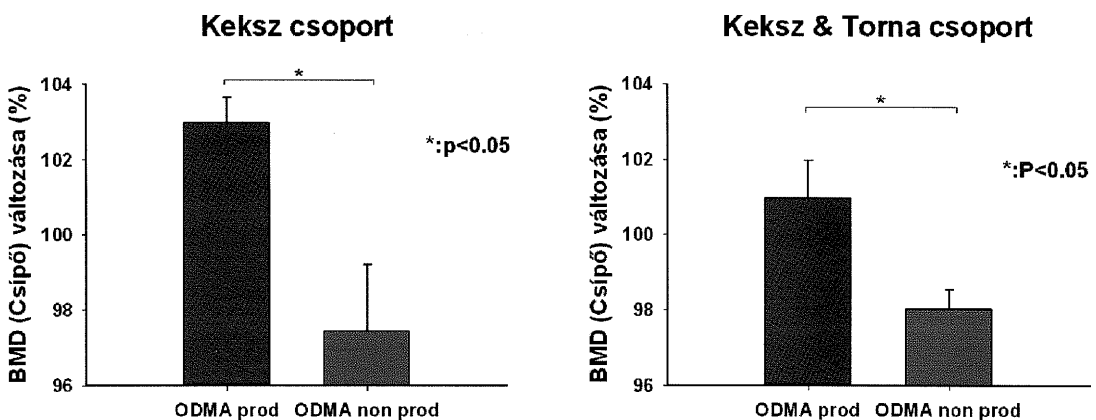
populációban a csontsűrűség csökkenését. A grafikonokról látható, hogy a csípő területén a fitoösztrogén tartalmú keksz fogyasztása már önmagában is képes volt szignifikáns változásokat eredményezni.



4.9.3. ábra Kiindulási BMD értékek



4.9.4. ábra Csontsűrűség változása a lumbális szakaszon



4.9.5. ábra Csontsűrűség változása a csípőtájékon

6. A thyroidea stimuláló hormon (TSH) monitorozás során szignifikáns emelkedést nem tapasztaltunk. Megjegyzendő, hogy két hölgy TSH értéke a tanulmány kezdetekor a normál érték felső határát kissé meghaladta, de trijód-tironin (T3) és szabad tiroxin (T4) értékeik a normál tartományba estek. Az egyik esetben a tübiopsia nem malignus cisztát igazolt, mely további teendőt nem igényelt. A másik esetben az endokrinológiai kivizsgálás során nem találtak elváltozást.

### Következtetések

Ez volt az első alkalom, hogy hazai populáción az öt leghatásosabb fitoösztrogén vérszintjét párhuzamosan tanulmányozhattuk. Ilyen (relatív) nagy populáción hosszútávú (1 éves) diétás intervenciós tanulmányt fitoösztrogénekkal még nem végeztek.

A magas magtartalmú süteménnyel sikerült elérnünk a fitoösztrogén szintek emelkedését, és annak az ázsiai vérszintekhez való közelítését. A plazma fitoösztrogén szintek közti nagymértékű szórás, az emésztés és felszívódás során meglévő egyéni különbségekből eredhet. Különösen érvényes ez a leghatásosabb equolra, amelyről ismert, hogy a populáció egy része ún. „equol termelő”, míg másik része nem termel equolt (Atkinson és mtsai, 2004). Ennek az egyéni varianciának a pontos okai jelenleg még feltáratlanok, de lehetséges a bélflóra különbözőségének szerepe.

A szakirodalomból ismert, hogy a hypothyreosis utánozhatja a menopausalis tüneteket, ezért a megkezdett hormonpótló kezelés előtt feltétlenül kívánatos a subklinikus hypothyreosis kiszűrése. Ha a haszonállatok takarmánya nagy mennyiségű (40%) szójafehérjét tartalmaz, golyva alakul ki náluk, melyet elősegít a jódmentes étrend is (Kimura és mtsai, 1976; Filisetti és Lajolo, 1981). Ennek oka feltehetően az lehet, hogy a szójában legnagyobb mennyiségben előforduló izoflavonok (a genistein és a daidzein) gátolják a pajzsmirigy hormonképzés kulcsenzimeit: a thyroid peroxidázt (Divi és mtsai, 1997) és az 5'-dehidrogenázt (Cody és mtsai, 1989). Ezen enzimek gátlása csökkent keringő T3, T4 szinteket eredményez, mely a hipofízis elülső lebenyéből fokozott TSH elválasztást indukál. A megemelkedett TSH pedig stimulálja a pajzsmirigy növekedését, ezáltal golyvát okoz. Mindezek ellenére nőstény patkányokon végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a szója izoflavonok sem önmagukban, sem jódhiánnyal összefüggésben nem képesek golyvát okozni (Son és mtsai, 2001), sokkal valószínűbb több, ma még ismeretlen faktor együttes hatása. Ezt az is alátámasztja, hogy Ázsiában, ahol nagyon sok szóját fogyasztanak, a populációban nem fordul elő

szignifikánsan magasabb arányban a golyva. Ezt megerősíti az a humán tanulmány is, ahol 38 postmenopauzás nőnek 90 mg izoflavont adva nem találtak különbséget a placebóval és izoflavonnal kezelt csoport pajzsmirigy funkciói között (Bruce és mtsai, 2000). Jelen tanulmányunkban az intervenciós periódus alatt, szintén nem találtunk a kiindulási vérszintekhez képest TSH eltérést.

Figyelembe véve, hogy egyes statisztikák szerint a szója fehérjére a magyar lakosság 6%-a allergiás, feltűnő, hogy erre utaló tüneteket a tanulmány során nem tapasztaltunk. Valószínű, hogy eleve nem is jelentkezett ismert szója-allergiás a programba.

A hazai étrend igen szegényes fitoösztrogén bevitelt jelent. A fitoösztrogének számos jótékony hatása miatt, annak már mérsékelt emelése is hosszútávon jelentős javulást eredményezhetne az érintett populáció népegészségügyi mutatóiban.

Csontsűrűség vizsgálat szempontjából az egy év rövidtávú követésnek minősül. A csoportok között a szignifikancia mértékét el nem érő különbségekből – bár tendenciájukat tekintve a feltételezett pozitív hatást – legalábbis a combnyak tekintetében – alátámasztani látszanak, definitív konklúzió még nem vonható le. Mindenesetre, a megfelelő étrendnek és a rendszeres testmozgásnak a csonttömeg megőrzésében, esetleg javításában a menopausa után is jelentős szerepe lehet.



## 5 Összefoglalás

Munkámban a makrofág migráció inhibitor faktor fenilpiruvát tautomeráz aktivitásának *in vitro* gátlási lehetőségeit vizsgáltam, azt feltételezve, hogy a proinflammatorikus citokin enzimaktivitásának szerepe van a gyulladásos mechanizmusban. Olyan potenciális molekulacsaldokat kerestem, amely alkalmas lehet a MIF gyulladáskeltő hatásának befolyásolására- esetlegesen *in vivo* rendszerben is.

Továbbá vizsgáltam a MIF jelenlétét és enzimaktivitását humán gyulladásos reakciókban és a központi idegrendszerben is.

Új eredmények:

1. Tanulmányunk első részében a MIF gyulladásos citokin fenilpiruvát tautomeráz enzimaktivitását vizsgáltuk. Elsőként a dopachrom tautomeráz reakciót hatékonyan gátló acetaminophent, majd a gyulladásos folyamatok tradicionális ellenszereként használt növényi hatóanyag-kivonatokat. Az acetaminophen nem csak a MIF dopachrom tautomeráz aktivitását gátolja (Senter és mtsai, 2002), hanem a fenilpiruvát tautomériát is. A vizsgált gyulladásgátló kismolekulák koncentrációfüggő módon gátolták a MIF mediált fenilpiruvát tautomeráz reakciót ketonáz és enoláz irányban (Molnár és Garai, 2005).
2. A növényi hatóanyagokhoz hasonló szerkezetű, kémiai úton szintetizált vegyületcsoportokat teszteltük a MIF enol-keto és keto-enol irányú reakciójára. A növényi hatóanyagokhoz képest a szintetikus vegyületekkel ugyan elértük közel ugyanazt a hatást, de azoknál eredményesebb gátlást eddig még nem tudtunk produkálni.
3. Mivel a ketontestekről leírták, hogy képesek kivédeni bizonyos gyulladásos folyamatokat (Sato és mtsai, 1992; Sjögren és mtsai, 1999), vizsgáltuk azt is, hogyan befolyásolják a ketontestek a proinflammatorikus citokin enzimaktivitását. A gyűrűs struktúrával nem rendelkező ketonok úgy tűnik *in vitro* erősebben gátolják a MIF ketonáz aktivitását (Garai és mtsai, 2005). Az acetoacetát és a  $\beta$ -hidroxi-vajsav vérszintje fiziológias állapotokban 70-150  $\mu\text{M}$  között van (Kalapos, 2003). Ezek *in vitro* MIF ketonáz aktivitást gátló hatását

figyelembe véve feltételezhetjük, hogy *in vivo* is képesek lehetnek a MIF enzimaktivitását befolyásolni. Ha igaz, hogy a ketontestek *in vivo* is gátolják a MIF ketonáz aktivitását, és ennek az enzimaktivitásnak esetleg szerepe van a MIF citokin funkciójában, akkor a gazdaszervezet és a behatoló ágens szempontjából is kulcsszerepe lehet annak az ismert jelenségnek, hogy az infekció megakadályozza az éhező állatok ketontest produkcióját (Neufeld és mtsai, 1976).

4. Az enzimaktivitást megmértük a gyulladáshoz vezető folyamatokban szerepet játszó endotoxinok, valamint azok komponenseinek jelenlétében is. Az eltérő szerkezetű LPS-ek koncentrációfüggő módon befolyásolták a MIF tautomeráz aktivitását. A reakció gátló vagy serkentő irányát nagyban meghatározta az LPS szerkezeti felépítettsége. Azonban jelen tájékoztató jellegű vizsgálatunkban nem teszteltünk olyan sokféle LPS-t, hogy messzemenő következtetést vonhatnánk le a szerkezet hatás összefüggés tekintetében.
5. A MIF enzimaktivására gyakorolt hatás tekintetében teszteltünk néhány olyan fitoösztrogént is, melyekről ismert, hogy képesek a csontsűrűséget jótékonyan befolyásolni (Fanti és mtsai, 1998), illetve rendelkeznek ösztrogénszerű hatással. A fenti molekulákon kívül vizsgáltunk néhány egyéb flavonoidot is. Ezek kémiai szerkezetüket tekintve vagy a fitoösztrogénekhez hasonlatosak, vagy a már korábban hatékonynak bizonyult növényi vegyületekhez. Eredményeink szerint a MIF ketonáz reakcióját legeredményesebben a daidzein gátolta. Az itt vizsgált flavonoidok és fitoösztrogének gátló hatása elmaradt a korábban tesztelt gyulladásgátló növényi hatóanyagokétól.
6. A MIF-fel összefüggésbe hozható humán megbetegedések közül ízületi gyulladásban, endometriosisban és hasi műtéten átesett betegek mintáit vizsgáltuk. Az ízületi gyulladásban szenvedő betegek ízületi folyadékát, valamint szérumát, a laparoscopia során gyűjtött peritonealis mosófolyadékot, (endometriosisos és kontroll) csoportban mind a MIF tartalomra, mind a MIF enzimaktivására megmértük. Humán mintákban is sikerült detektálnunk a MIF jelenlétének és mennyiségének megfelelő enzimaktivitást. Azonban mind az ízületi folyadékban, mind a peritonealis folyadékban csak a fenilpiruvát enoláz aktivitás volt értékelhető. A peritonealis folyadék enoláz aktivitásának mértéke, és immunoreaktivitása is magasabb volt az endometriosis I-es és II-es stádiumaiban összehasonlítva az endometriosisos mintájával.

(Garai és mtsai, 2006). Az ízületi folyadékokban és a hozzájuk tartozó szérumokban különösen magas MIF szintet a Szeronegatív Spondylarthritiben mértünk.

Ezen mintákban jelenlevő MIF enzimaktivitást néhány, a Sigma tautomerázt hatékonyan gátló molekulával is vizsgáltuk, s azt tapasztaltuk, hogy hasonlóan gátolják e minták enoláz reakcióját is.

A bélmegnyitással járó, és nem járó hasi műtéteken átesett betegek szérumában laboratóriumunk a MIF tartalmat, a PTE ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézete számos egyéb citokint és gyulladásos markert vizsgált. A szérumok MIF tartalma, a májrezekciós csoportban, közvetlenül a műtét után, szignifikánsan magasabb, a normál tartományt jócskán meghaladó értékeket mutat, mely a műtétet követő nap ismét a normál tartományba került. Mivel mindkét betegcsoport tagjai daganatos betegek voltak és műtét előtti MIF-értékük nem különbözött egymástól, ezért a májrezekción átesett betegek magasabb MIF értékét az operáció miatti májsejt károsodással illetve, a sérült májszövetből történő fokozott MIF- felszabadulással magyarázhatjuk (Márton és mtsai, 2004).

7. Az egyik leghatékonyabb enzim inhibitor, a kávésav hatását *in vivo* CFA arthritis modellben is vizsgáltuk. Eredményeink alapján elmondható, hogy a kávésav koncentrációfüggő módon, szignifikánsan csökkentette mind az oedema, mind a fájdalom mértékét a kontroll állatokéhoz képest, mely csupán indirekt bizonyítéka lehet az ízületi gyulladásban is részt vevő MIF és annak enzimaktivitását gátló kismolekula kapcsolata között.
8. A mikrotubulusok és a MIF funkcionális kapcsolatát feltételezve vizsgáltuk a nagy MAP tartalmú tubulin preparátum tautomeráz enzimaktivitását, és annak befolyásolhatóságát a MIF-et hatékony gátló kismolekulákkal. Egyes anyagok tubulin polimerizációjára gyakorolt hatását is mértünk. A kismolekulák és a flavonoidok a Sigma tautomeráz enzimaktivitásához hasonlóan, koncentráció függő módon gátolták a tubulinban jelenlevő MIF ketonáz és enoláz reakcióját, azonban  $IC_{50}$  értékük magasabb volt. Ez azzal magyarázható, hogy a tubulinnal összefüggésben levő MIF-hez valószínűleg nem tudtak a vizsgált molekulák kellő mértékben hozzáférni. A tubulin polimerizációját egyes molekulák gátolták, míg mások serkentették.

A MIF tubulin kapcsolatát több cikluson keresztül végigvitt tisztítással, valamint egy úgynevezett, HM (high molar) tubulin izolálási módszerrel

vizsgáltuk. A harmadik ciklust követően, illetve az erőteljes (HM) módszerrel tisztított tubulinban már sem ELISA-val, sem Western blottal nem találtunk kimutatható mennyiségű MIF-et, ugyanakkor enzimaktivitás sem volt detektálható. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a MIF olyan mikrotubulus asszociált fehérjeként viselkedik, mely többszörös, illetve erőteljes tisztítás során eltávolítható a tubulintól.

Morfológiai vizsgálatok során a MIF agyi lokalizációját vizsgáltuk, valamint elektronmikroszkópos vizsgálattal próbáltunk összefüggést találni a MIF és a tubulin között. A MIF megtalálható mind a gátló, mind a serkentő neuronokban. Polimerizált tubulinban a MIF apró vesiculumok formájában a tubulin átmetszetek körül helyezkedik el.

9. A postmenopausalis osteoporosist jelenleg vagy hormonpótló kezeléssel, vagy alternatív módszerekkel próbálják megelőzni. A hormonpótló kezelések mellékhatásai miatt a menopauzás populáció körében egyre nagyobb teret hódítanak a különféle növényekből származó ösztrogén hatással rendelkező vegyületek, a fitoösztrogének. Intervenciós tanulmányunkban menopauzás populációban a fitoösztrogének és a célzott mozgásprogram osteoporosis prevencióra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Diétás intervencióval sikerült elérnünk a fitoösztrogén szintek jelentős emelkedését. A csontsűrűség vizsgálat szempontjából az egy év rövidtávú követésnek minősül, de az ODMA és equol producerek esetében a combnyak és ágyéki gerinc szakaszon, hosszabb távon pozitív hatást remélhetünk. A növényi ösztrogének MIF tautomeráz aktivitását befolyásoló hatása, valamint csonttömeg csökkenést megelőző hatása közti összefüggést egy nemrégiben leírt tanulmány is megerősíti. Eszerint a MIF szerepet játszik az ösztrogénhiány miatt kialakult csontvesztésben (Oshima és mtsai, 2006).

A MIF egy szinte „elfeledett” citokin volt, és csak az elmúlt 15 évben vált az immunoneuroendokrin kutatási határterület egyik megkülönböztetett célpontjává. Azonban a mai napig nem ismert „valódi” receptora, és számos funkciójának mechanizmusa vár még mindig tisztázásra.

Kutatómunkánk fenti leírása összegzi szerény hozzájárulásunkat e téren.

## 6 Rövidítések

4-OT	4-oxalokrotonát-tautomeráz
AA	arachidonsav
ABC komplex	avidin biotin peroxidáz komplex
ABCA1	ATP binding cassette transporter subfamily A1
ACTH	adrenokortikotrop hormon
APACHE II	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
A $\beta$	amyloid $\beta$ - protein
BMD	csont ásványianyag tartalom (Bone Mineral Density)
BSA	marha (bovine) szérum albumin
cAMP	ciklikus adenosin 3', 5'-monofoszfát
CFA	Komplett Freund Adjuváns
CHMI	5-karboximetil-2-hidroxiukonát-izomeráz
CIA	II-es típusú, kollagén indukált arthritis
CLP	Cökum lekötés és punkció
cPLA2	citoplazmatikus foszfolipáz A <sub>2</sub>
CRF	Corticotropin-Releasing Factor
CRP	C-reaktív protein
Cys	Cisztein
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DELFLIA	Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay
DES	szintetikus ösztrogén (diethylstilbösztrol)
DEXA	Dual-Energy X-Ray Absorptiometry
DHICA	5,6-dihidroxiindol-2-karboxisav
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EGTA	ethylen glycol-bis(aminoethylether)-tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
ERK	Extracelluláris szignál-Reguláló Kináz
ER- $\alpha$	ösztrogén alfa receptor
ER- $\beta$	ösztrogén béta receptor
FAK	Fokális Adhéziós Kináz

GM-CSF	Granulocytá–Makrofág-Colonia-Stimuláló Faktor
hCG	humán choriális gonadotropin
HM	high molar
HPA tengely	hypothalamus-hipofízis-mellékvese tengely (Hypothalamus-Pituitary gland-Adrenal gland)
HRP	torma-peroxidáz (Horse Raddish Peroxidase)
IC	inhibitoros koncentráció
IGT	károsodott glükóz tolerancia (Impaired Glucose Tolerance)
IL	Interleukin
INF- $\gamma$	Interferon-gamma
ISO-1	( <i>S,R</i> )-3-(4-hidroxifenil)-4,5-dihidro-5-izoxazol ecetsav metilészter
JAB-1	c-Jun Activation domain Binding protein-1
KDO	2-keto-3-dezoxi-oktonsav
Km	Michaelis-állandó
LBP	LPS-Binding Protein
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	lipopoliszacharid
mAb	monoklonális antitest
MAP	Mikrotubulus-Asszociált Protein
MAPK	Mitogén-Aktivált Protein Kináz
MCP-1	monocyta kemotaktikus protein-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1)
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIF (-/-)	MIF hiányos (knock-out)
MIF	Makrofág Migráció Inhibitor Faktor
MLCK	Miozin könnyűlánc kináz (Myosin Light Chain Kinase)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MODS	Multiple Organ Dysfunction Score
mRNS	messenger RNS
MTOC	Microtubulus Organizáló Centrum
NF- $\kappa$ B	Nukleáris Faktor-kappa B
NMR	Nukleáris Mágneses Rezonancia
NO	nitrogénoxid

NSAID	nem szteroid gyulladásgátló szer (Non-Steroidal Antiinflammatory Drug)
ODMA	o-desmethyl-angolesin
OH-PP	<i>p</i> -hidroxifenilpiruvát
OVX	ovariectomizált
ox-LDL	oxidált LDL
PBS	phosphat buffer salin
PP	fenilpiruvát
QSAR	kvantitatív szerkezet hatás összefüggések (Quantitative Structure Activity Relationship)
RA	rheumatoid arthritis
RANKL rMIF	Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ligand rekombináns MIF
SNRA	Szeronegatív Rheumatoid Arthritis
SNSA	Szeronegatív Spondylarthritis
SPEA	Streptococcal Pyrogen Exotoxin A
T3	trijódtironin
T4	tiroxin
TLR4	Toll Like Receptor-4
TNF	Tumor Necrosis Factor
TR-FIA	Time Resolved Fluoroimmunoassay
TSH	thyreotrop hormon
TSST-1	Toxikus Shock Syndrome Toxin-1
Type II ER	II-es típusú ösztrogénköti hely (Type II Estrogen binding site)

## 7 Táblázatok

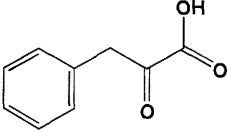
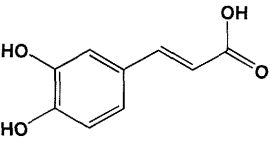
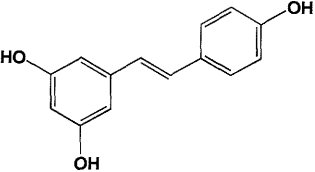
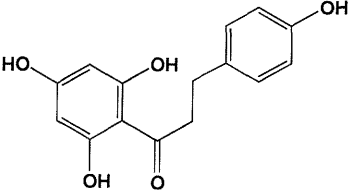
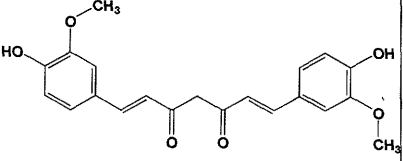
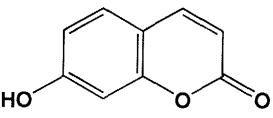
4.1.1. Táblázat A MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitás gátlásának mértéke (IC<sub>50</sub>)

Vegyület neve	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>Fenilpropán származékok</b>		<b>Enoláz</b>
<b>Ketonáz</b>		
Kávésav	0,5	2,0
Kurkumin	0,7	12,2
Klorogénsav	7,6	127,0
Rozmaringosav	13,8	65,6
p-Kumársav	18,1	103,3
Fahéjsav	20,9	229,6
Ferulasav	31,7	85,3
Izoeugenol	50,4	129,0
o-Kumársav	87,8	175,7
Eugenol	165,9	n.a.
Estragol	>10000*	n.a.
<b>Kumarin származékok</b>		
Umbelliferon	2,6	19,5
Kumarin	88,8	n.a.
Szkoipoletin	133,8	n.a.
<b>Egyéb</b>		
Acetaminophen	1,0	2,6
Resveratrol	1,9	28,0
Floretin	4,8	84,1
Boldin	5,7	77,9
Karnozinsav	15,5	115,8
Methotrexat	15,6	63,7
Kinin	34,9	156,3
Galangin	36,9	143,7
Folsav	62,7	80,2
Partenolid	3624,1	n.a.
Gentizinsav	>10000*	n.a.
Tropolon	>10000*	n.a.
<b>NSAID</b>		
Piroxicam	120,9	74,8
Phenylbutazon	7126,7	376,6
Ibuprofen	10334,3	109,6

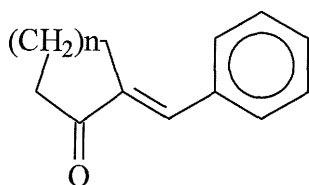
na: nincs adat



4.1.2. Táblázat A MIF leghatékonyabb gátlóinak és a fenilpiruvát szerkezeti képletének összehasonlítása

Közönséges név	Kémiai név	Szerkezet
<b>Fenilpiroszólósav</b>	Phenylpyruvat	
<b>Kávésav</b>	3,4-dihydroxycinnamic acid	
<b>Resveratrol</b>	trans 3,5,4' trihydroxy stilbene	
<b>Floretin</b>	3-[4-hydroxyphenyl]-1-[2,4,6-trihydroxyphenyl]-1-propanone	
<b>Kurkumin</b>	1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione	
<b>Umbelliferon</b>	7-Hydroxycoumarin	

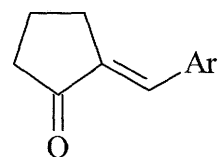
4.2.1. Táblázat 2-Benzilidén-cikloalkanonok



Vegyület	n	IC <sub>50</sub> (μM)
1	1	6,24
2	2	17,66
3	3	104,32
4	4	170,56

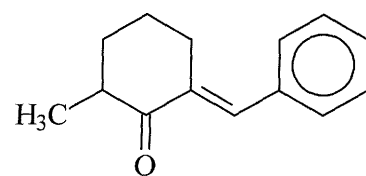
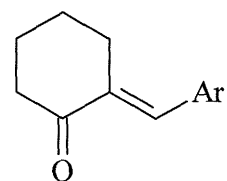
#### 4.2.2. Táblázat Szubsztituált 2-arilidenciklopentanonok

Vegy.	Ar	IC <sub>50</sub> (μM)
5	4'-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	178,76
6	2'-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	187,02
7	4'-CH <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3,87
8	3'-CH <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	26,53
9	2'-CH <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2,48
10	4'-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	25,36
11	3'-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	55,8
12	2'-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2,83
13	4'-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	0,79
14	4'-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	42,21
15	2',4'-(CH <sub>3</sub> O) <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	90,28
16	3',4'-(CH <sub>3</sub> O) <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	95,16
17	3',4',5'-(CH <sub>3</sub> O) <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	10,84
18	3',4'-OCH <sub>2</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	1,63



#### 4.2.3. Táblázat Szubsztituált 2-arilidenciklohexanonok

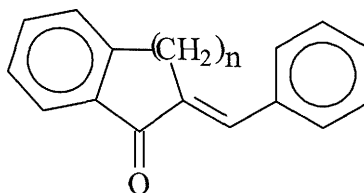
Vegyület	Ar	IC <sub>50</sub> (μM)
19	4'-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	91,63
20	3'-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	88,21
21	2'-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	1495,13
22	4'-CH <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3,09
23	2'-CH <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	122,46
24	4'-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	62,78
25	3'-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	85,33
26	2'-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	60,68
27	2',4'-(CH <sub>3</sub> O) <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	113,73
28	3',4'-OCH <sub>2</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	74,93



(29) IC<sub>50</sub> = 74,62 μM

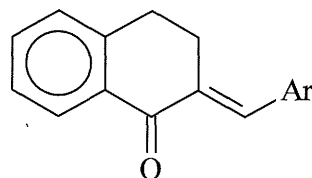
#### 4.2.4. Táblázat 2-Benzilidén-benzocikloalkanok

Vegyület	n	IC <sub>50</sub> (μM)
30	1	82,78
31	2	127,42
32	3	179,72



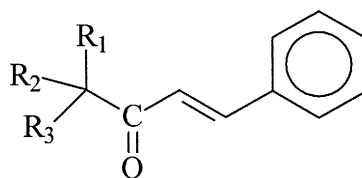
#### 4.2.5. Táblázat Szubsztituált 2-arilidén-benzociklohexanok

Vegyület	Ar	IC <sub>50</sub> (μM)
33	4'-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	16,50
34	4'-CH <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	56,97
35	4'-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	59,10
36	2'-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2640,70
37	2',6'-Cl <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	58,93
38	2',4'-Cl <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	16,90
39	3',4'-Cl <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	2618,42
40	4'-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	52,16
41	4'-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	72,42
42	3'-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	63,07
43	2'-fural	57,70
44	2'-tienil	54,01
45	2'-pirrolil	141,8
46	N-metil-2'-pirrolil	23,82
47	3'-indolil	58,83
48	2'-piridil	5,63
49	3'-piridil	20,26
50	4'-piridil	21,04



#### 4.2.6. Táblázat Aciklikus $\alpha,\beta$ -telítetlen ketonok

Vegyület	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)
51	H	H	H	1,18
52	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	50,38
53	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	100,04



#### 4.5.1. Táblázat Fitoösztrogének és flavonoidok hatása a MIF tautomerázra

Név	MIF	
	ketonáz	enoláz
<b>Csontsűrűséget befolyásoló fitoösztrogének IC<sub>50</sub> (μM)</b>		
Daidzein	16,33	21,33
Equol	76,70	30,54
Genistein	130,58	21,40
<b>Egyéb flavonoidok IC<sub>50</sub> (μM)</b>		
Morin	32,6	16,2
Ellagic acid	20,5	140,6
Naringenin	29,5	74,0

#### 4.8.1. Táblázat Kismolekulák hatása a tubulinra

Név	Tubulin		
	Ketonáz IC <sub>50</sub> (μM)	Enoláz IC <sub>50</sub> (μM)	Polimerizáció mértéke
Morin	9,7	74,7	-
Floretin	20,6	213,3	-
Resveratrol	28,2	68,7	--
Klorogénsav	35,4	494,2	n.a.
Boldin	37,3	131,2	n.a.
Umbelliferon	40,8	71,0	-
Kávésav	42,2	2,0	0
Rozmaringsav	46,0	92,3	---
Ellaginsav	52,4	342,4	--
Naringenin	55,1	24,2	---
Daidzein	65,1	n.a.	n.a.
Acetaminophen	103,3	185,2	+
Equol	212,5	491,7	0

n.a. nincs adat

## 8 Ábrajegyzék

1.2.1. ábra A MIF szalagos szerkezete .....	5
1.2.2. ábra Hasonlóság a bakteriális enzimekre .....	6
1.3.1. ábra A MIF hatásmechanizmusa.....	7
1.5.1. ábra MIF glükokortikoid ellenreguláció .....	12
1.6.1. ábra A tautomeráz reakció szubsztrátjai .....	13
1.6.2. ábra A MIF homotrimer molekula, közepén csatorna húzódik. ....	14
3.6.1. ábra Balb/c egér tömegérése .....	37
3.6.2. ábra Lábduzzadás mérés Dynamic plantar plethysmometerrel .....	38
3.6.3. ábra Fájdalomküszöb mérés Dynamic plantar aesthesiometerrel.....	38
4.1.1 ábra Lineweaver-Burk analízis (kávésavval).....	41
4.3.1. ábra MIF fenilpiruvát ketonáz gátlása ketonokkal .....	47
4.4.1. ábra <i>E.coli</i> "O83" hatása a MIF ketonáz reakciójára .....	49
4.5.1. ábra Növényi fenolok és polifenolok.....	51
4.6.1. ábra A rheumatoid arthritis típusos képe a kézfejen.....	55
4.6.2. ábra Ízületi folyadék (A) és szérumok (B) MIF tartalma az egyes betegségekben .....	57
4.6.3. ábra Szérum MIF tartalom egységnyi fehérjére vonatkoztatva .....	57
4.6.4. ábra Szérum minták Western blotja anti-MIF antitesttel.....	58
4.6.5. ábra Endometriosis képe hastükrözéssel.....	59
4.6.6. ábra Korreláció a peritonealis folyadék enoláz aktivitása és MIF tartalma között .....	61
4.6.7. ábra A MIF enoláz aktivitása.....	61
4.6.8. ábra Hasmosófolyadék MIF tartalma .....	61
4.6.9. ábra Western blot hasmosófolyadékból anti-MIF antitesttel.....	62
4.6.10. ábra Szérum MIF szintek változása a műtét előtt és az azt követő napokban ....	65
4.7.1. ábra Kávésav kezelés hatása a CFA-val kiváltott lábduzzadásra .....	68
4.7.2. ábra Kávésav kezelés hatása a CFA-val kiváltott gyulladáshoz vezető mechanikai allodyniára .....	68
4.7.3. ábra Kávésav kezelés hatása a CFA-val kiváltott IL-1 $\beta$ termelésre az ízületben. ....	69
4.8.1. ábra Mikrotubulus.....	70
4.8.2 ábra A tubulin preparátum Western blot analízise anti-MIF antitesttel.....	73
4.8.3 ábra Három ciklus tubulin (T) és felülűző (S) Western Blotja anti-MIF antitesttel .....	74
4.8.4 ábra Tubulin preparátumok ketonáz és enoláz aktivitása .....	74
4.8.5 ábra Ketonáz aktivitás gátlása (Naringeninnel) .....	75
4.8.6 ábra Enoláz aktivitás gátlása (Naringeninnel) .....	75
4.8.7 ábra A naringenin hatása a tubulin polimerizációra .....	76
4.8.8. ábra Fénymikroszkópos felvétel, ami MIF-immunpozitív piramissejteket (nyilak) mutat az Ammon szarv (hippocampus) piramissejt rétegében. ....	77
4.8.9. ábra MIF-immunreaktív agykérgi gátló idegsejt fénymikroszkópos képe. A piros nyíl a sejttestre mutat, a fehér nyíl a sejt egyik dendritjét jelzi. ....	77
4.8.10. ábra Egy MIF-immunpozitív idegsejt sejttestjének elektronmikroszkópos képe. Az n jelzés a sejtmagot jelzi. ....	78
4.8.11. ábra Egy MIF-immunjelölt idegsejt sejttestjének elektronmikroszkópos képe. A nyíllal jelzett keresztmetszetek a sejt szomszédságában megfigyelhető myelinizált axonokra mutatnak.....	78

4.8.12 MIF-immunreaktív idegsejtek dendritjének elektronmikroszkópos képe. A nyilak a dendritre (A), mikrotubulusokra (B) mutatnak.....	79
4.9.1. ábra Szérum fitoösztrogén szintek az első két negyedévben.....	84
4.9.2. ábra Az equol producer (>5 nM/l) csontsűrűség változása.....	85
4.9.3. ábra Kiindulási BMD értékek.....	86
4.9.4. ábra Csontsűrűség változása a lumbális szakaszon.....	86
4.9.5. ábra Csontsűrűség változása a csípőtájékon.....	86

## 9 Irodalomjegyzék

- Aeberli D., Yang Y., Mansell A., Santos L., Leech M., Morand E. F. Endogenous macrophage migration inhibitory factor modulates glucocorticoid sensitivity in macrophages via effects on MAP kinase phosphatase-1 and p38 MAP kinase. *FEBS Lett.* 580, 974–981 (2006)
- Akoum A., Kong J., Metz C., Beaumont M. C. Spontaneous and stimulated secretion of monocyte chemotactic protein-1 and macrophage migration inhibitory factor by peritoneal macrophages in women with and without endometriosis. *Fertil. Steril.* 77, 989-994 (2002a)
- Akoum A., Kats R., Lawson C., Metz C. Macrophage migration inhibitory factor expression in the human endometrium is cycle phase-dependent and markedly increased in women having endometriosis. *Fertil. Steril.* 78, S200-S200 (2002b)
- Akoum A., Metz C. N., Morin M. Marked increase in macrophage migration inhibitory factor synthesis and secretion in human endometrial cells in response to human chorionic gonadotropin hormone. *J Clin. Endocr. Metab.* 90, 2904-2910 (2005)
- Akoum A., Metz C. N., Al-Akoum M., Kats R. Macrophage migration inhibitory factor expression in the intrauterine endometrium of women with endometriosis varies with disease stage, infertility status, and pelvic pain. *Fertil. Steril.* 85, 1379-1385 (2006)
- Al-Abed Y., Dabideen D., Aljabari B., Valster A., Messmer D., Ochani M., Tanovic M., Ochani K., Bacher M., Nicoletti F., Metz C., Pavlov V. A., Miller E. J., Tracey K. J. ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis. *J Biol Chem.* 280, 36541-36544 (2005)
- Alekel D. L., Germain A. S., Peterson C. T., Hanson K. B., Stewart J. W., Toda T., Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am. J.Clin. Nutr.* 72, 844–852 (2000)
- Al-Nakib M. T, Lóránd T., Földesi A., Varghese R. The in vitro antimycotic activity and acute toxicity of third generation benzylidenetetralones and heteroarylidenetetralones. *Med. Prin. Pract.* 10, 191-196. (2001)
- Arai Y., Uehara M., Sato Y., Kimira M., Eboshida A., Adlercreutz H., Watanabe S. Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake. *J. Epidemiol.* 10, 127-135 (2000)
- Atkinson C., Berman S., Humbert O., Lampe J. W. In vitro incubation of human feces with daidzein and antibiotics suggests interindividual differences in the bacteria responsible for equol production. *J. Nutr.* 134, 596-599 (2004)
- Atsumi T., Nishihira J., Makita Z., Koike T. Enhancement of oxidised low-density lipoprotein uptake by macrophages in response to macrophage migration inhibitory factor. *Cytokine* 12, 1553–1556 (2000)
- Avila J. Microtubule dynamics. *FASEB J.* 4, 3284-3290 (1990)
- Bacher M., Metz C. N., Calandra T., Mayer K., Chesney J., Lohoff M., Gemsa D., Donnelly T., Bucala R. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7849-7854. (1996)
- Bacher M., Meinhardt A., Lan H. Y., Mu W., Metz C. N., Chesney J. A., Calandra T., Gemsa D., Donnelly T., Atkins R. C., Bucala R. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am. J. Pathol.* 150, 235-246 (1997)
- Bacher M., Meinhardt A., Lan H. Y., Dhabhar F. S., Mu W., Metz C. N., Chesney J. A., Gemsa D., Donnelly T., Atkins R. C., Bucala R. MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function. *Mol. Med.* 4, 217–230 (1998)
- Baimbridge K. G., Celio M R., Rogers J. H. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.* 15, 303-308 (1992)
- Baugh J. A., Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor. *Crit. Care Med.* 30, S27-S35 (2002)
- Baugh J.A., Donnelly S.C. Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. *J. Endocrinol.* 179, 15–23. (2003)

Baumann R., Casaulta C., Simon D., Conus S., Yousefi S., Simon H. U. Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *FASEB J.* 17, 2221-2230 (2003)

Beishuizen A., Thijs L. G., Haanen C., Vermes I. Macrophage migration inhibitory factor and hypothalamo-pituitary function during critical illness. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 2811-2816 (2001)

Belmont L. D., Hyman A. A., Sawin K. E., Mitchison T. J. Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts, *Cell* 62, 579-589 (1990)

Bendrat K., Al-Abed Y., Callaway D. J., Peng T., Calandra T., Metz C. N., Bucala R. Biochemical and mutational investigations of the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry* 36, 15356-15362 (1997)

Benigni F., Atsumi T., Calandra T., Metz C., Echtenacher B., Peng T., Bucala R. The proinflammatory mediator macrophage migration inhibitory factor induces glucose catabolism in muscle. *J Clin Invest* 106, 1291-1300 (2000)

Bennetts H. W., Underwood E. J., Shier F. L. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust. Vet. J.* 22, 2-12 (1946)

Bernhagen J., Calandra T., Mitchell R. A., Martin S. B., Tracey K. J., Voelter W., Manogue K. R., Cerami A., Bucala R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxemia. *Nature.* 365, 756-759 (1993)

Bernhagen J., Mitchell R. A., Calandra T., Voelter W., Cerami A., Bucala R. Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry* 33, 14144-14155 (1994)

Bernhagen J., Calandra T., Bucala R. Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. *J. Mol. Med.* 76, 151-161 (1998)

Bhisey A. N., Freed J. J. Ameboid movement induced in cultured macrophages by colchicine or vinblastine. *Exp. Cell Res.* 64, 419-429 (1971)

Bloom B., Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 153, 80-82 (1966)

Boccardo F., Lunardi G., Guglielmini P., Parodi M., Murialdo R., Schettini G., Rubagotti A., Serum enterolactone levels and the risk of breast cancer in women with palpable cysts. *Eur. J. Cancer* 40, 84-89 (2004)

Boumpas D. T., Wilder R. I. Corticosteroids. In: *Arthritis and Allied Conditions*. Koopman WJ (Ed.), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 827-847 (2001)

Bozza M., Kolakowski L. F., Jr., Jenkins N. A., Gilbert D. J., Copeland N. G., David J. R., Gerard C. Structural characterization and chromosomal location of the mouse macrophage migration inhibitory factor gene and pseudogenes. *Genomics* 27, 412-419 (1995)

Bozza M., Satoskar A. R., Lin G., Lu B., Humbles A. A., Gerard C., David, J. R. Targeted Disruption of Migration Inhibitory Factor Gene Reveals Its Critical Role in Sepsis *J. Exp. Med.* 189, 341-346 (1999)

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)

Bruce B., Spiller G. A., Holloway L. Soy isoflavones do not have an antithyroid effect in postmenopausal women over 64 years of age. *FASEB J.* 11,193 (2000)

Burger-Kentischer A., Goebel H., Seiler R., Fraedrich G., Schaefer H. E., Dimmeler S., Kleemann R., Bernhagen J., Ihling C. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation* 105, 1561-1566 (2002)

Burns R. G. Alpha-, beta-, and gamma-tubulins: sequence comparisons and structural constraints. *Cell Motil. Cytoskeleton* 20, 181-189 (1991)

Cadenas E., Packer L. *Handbook of antioxidants*. NY: Marcel Dekker, Inc. (1996)



- Calandra T., Bernhagen J., Mitchell R. A., Bucala R. Macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage-migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.*, 179, 1895-1902 (1994)
- Calandra T., Bernhagen J., Metz C. N., Spiegel L. A., Bacher M., Donnelly T., Cerami A., Bucala R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377, 68-71 (1995)
- Calandra T., Spiegel L. A., Metz C. N., Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 11383-11388 (1998)
- Calandra T., Echtenacher B., Roy D. L., Pugin J., Metz C. N., Hultner L., Heumann D., Mannel D., Bucala R., Glauser M. P. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat. Med.* 6, 164-170 (2000)
- Calandra T., Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 791-800 (2003)
- Cao W. G., Morin M., Metz C., Maheux R., Akoum A. Stimulation of macrophage migration inhibitory factor expression in endometrial stromal cells by interleukin 1, beta involving the nuclear transcription factor NF kappa B. *Biol. Reprod.* 73, 565-570 (2005)
- Cassimeris L., Pryer N. K., Salmon E. D. Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J. Cell Biol.* 107, 2223-2231 (1988)
- Castoldi M., Popov A. V. Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expr. Purif.* 32, 83-88 (2003)
- Chang P., Stearns. T. Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function, *Nature Cell Biol.* 2, 30-35 (2000)
- Chesney J., Metz C., Bacher M., Peng T., Meinhardt A., Bucala R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol. Med.* 5, 181-191 (1999)
- Cheung H. T., Cantarow W. D., Sundharadas G. Colchicine and cytochalasin B (CB) effects on random movement, spreading, and adhesion of mouse macrophages. *Exp. Cell. Res.* 111, 95-103 (1978)
- Chiechi L. M., Secreto G., D'Amore M., Fanelli M., Venturelli E., Cantatore F., Valerio T., Laselva G., Loizzi P. Efficacy of a soy rich diet in preventing postmenopausal osteoporosis: the Menfis randomized trial. *Maturitas* 42, 295-300 (2002)
- Chook Y. M., Gray J. V., Ke H., Lipscomb W. N. The monofunctional chorismate mutase from *Bacillus subtilis*. Structure determination of chorismate mutase and its complexes with a transition state analog and prephenate, and implications for the mechanism of the enzymatic reaction. *J. Mol. Biol.* 240, 476-500 (1994)
- Cody V., Koehrl J., Hesch R.D. Structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of iodothyronine deiodinase. In: *Environmental Goitrogenesis*, Gaitan, E. (ed), pp. 57-69, CRC Press, Boca Raton F.L., (1989)
- Cresswell P. Assembly, transport and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 259-293 (1994)
- Crispe I. N. The effect of vinblastine, colchicine and hexylene glycol on migration of human monocytes. *Exp. Cell Res.* 100, 443-447 (1976)
- Crouse III J. R., Morgan T., Terry J. G., Ellis J., Vitlins M., Burke G.L., A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch. Intern. Med.* 159, 2070-2076 (1999)
- Cvetkovic I., Al-Abed Y., Miljkovic D., Maksimovic-Ivanic D., Roth J., Bacher M., Lan H. Y., Nicoletti F., Stosic-Grujicic S. Critical role of macrophage migration inhibitory factor activity in experimental autoimmune diabetes. *Endocrinology* 146, 2942-2951 (2005)
- Dalais F. S., Rice G. E., Wahlqvist M. L., Grehan M., Murkies A. L., Medley G., Ayton R., Strauss B. J. Effects of dietary phytoestrogens in postmenopausal women. *Climacteric* 1, 124-129 (1998)
- Dandona P., Nix D., Wilson M. F., Aljada A., Love J., Assicot M., Bohuon C. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 79, 1605-1608 (2000)

- Dandona P., Aljada A., Ghanim H., Mohanty P., Tripathy C., Hofmeyer D., Chaudhury A. Increased plasma concentration of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and MIF mRNA in mononuclear cells in the obese and the suppressive action of metformin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 5043–5047 (2004)
- Daun J. M., Cannon J. G. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortison-induced increases in cytosolic I $\kappa$ B $\alpha$ . *Am. J. Physiol.* 279, 1043-1049 (2000)
- David J. R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediator by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56, 72-77 (1966)
- David J. R. Erratum: Important note on recombinant macrophage migration inhibition factor. *J. Immunol.* 151 (1993)
- de Jong Y. P., Abadia-Molina A. C., Satoskar A. R., Clarke K., Rietdijk S. T., Faubion W. A., Mizoguch, E., Metz C. N., Alsahli M., ten Hove T., Keates A. C., Lubetsky J. B., Farrell R. J., Michetti P., van Deventer S. J., Lolis E., David J. R., Bhan A. K., Terhorst C. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat. Immunol.* 2, 1061-1066 (2001)
- del Vecchio M. T., Tripodi S. A., Arcuri F., Pergola L., Hako L., Vatti R., Cintorino M. Macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with tumor grading and combination endocrine treatment-related changes. *Prostate* 45, 51-57 (2000)
- Densmore C. L., Schauweker T. S., Gregory R. R., Webb B., Garcia E., Markaverich B. M. Chromatographic resolution of the type II estrogen binding site and a tyrosinase-like enzymatic activity from rat uterine nuclei. *Steroids.* 59, 282-287 (1994)
- Dimmock J. R., Kumar P., Nazarali A. J., Motaganahalli N. L., Kowalchuk T. P., Beazely M. A., Quail J. W., Oloo E. O., Allen T. M., Szydowski J., DeClercq E., Balzarini J. Cytotoxic 2,6-bis(arylidene)cyclohexanones and related compounds. *Eur. J. Med. Chem.* 35, 967–977 (2000)
- Dimmock J. R., Zello G. A., Oloo E.O., Quail J.W, Kraatz H.B., Perjesi P., Aradi F., Takacs-Novak K., Allen T.M., Santos C.L., Balzarini J., De Clercq E., Stables J.P. Correlations between cytotoxicity and topography of some 2-arylidenebenzocycloalkanones determined by X-ray crystallography. *J. Med. Chem.* 45, 3103-3111 (2002)
- Dios A., Mitchell R.A., Aljabari B., Lubetsky J., O'Connor K.A., Liao H., Senter P.D., Manogue K.R., Lolis E., Metz C., Bucala R., Callaway D. J. E., Al-Abed Y., Inhibition of MIF bioactivity by rational design of pharmacological inhibitors of MIF tautomerase activity. *J. Med. Chem.* 45, 2410-2416 (2002)
- Divi R. Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action. *Biochem Pharmacol.* 54, 1087-1096 (1997)
- Donnelly S. C., Haslett C., Reid P. T., Grant I. S., Wallace W. A., Metz C. N., Bruce L., Bucala R. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat. Med.* 3, 320-323 (1997)
- Dorai T., Aggarwal B.B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Letters* 215, 129-140 (2004)
- Dustin P. *Microtubules*, 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin (1984)
- Duvoix A., Blasius R., Delhalle S., Schnekenburger M., Morceau F., Henry E., Dicato M., Diederich M. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett.* 223, 181–190 (2005)
- Echtenacher B., Falk W., Mannel D. N., Krammer P. H. Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J. Immunol.* 145, 3762-3766 (1990)
- Eickhoff R., Wilhelm B., Renneberg H, Seitz J, Keppler C, Meinhardt A. Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa. *Mol. Med.* 7, 27-35 (2001)
- Eriksson H., Upchurch S., Hardin J.W., Peck E.J. Jr, Clark J.H. Heterogeneity of estrogen receptors in the cytosol and nuclear fractions of the rat uterus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81 1-7 (1978)
- Fanti P., Monier-Faugere M.C., Geng Z., Schmidt J., Morris P.E., Cohen D., Malluche H.H. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Int.* 8, 274-281 (1998)

- Filiseti T.M., Lajolo F.M. Effect of the ingestion of soybean fractions, raw or autoclaved, on the rat thyroid. *Arch. Latinoam. Nutr.* 31, 287-302 (1981)
- Fingerle-Rowson G, Petrenko O., Metz C.N., Forsthuber G., Mitchell R., Huss R., Moll U., Muller W., Bucala R. The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 9354–9359 (2003)
- Flieger O., Engling A., Bucala R., Lue H., Nickel W., Bernhagen J. Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS Letters* 551, 78–86 (2003)
- Footo A., Briganti E. M., Kipen Y., Santos L., Leech M., Morand E. F. Macrophage migration inhibitory factor in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 31, 268-273 (2004)
- Franke A. A., Custer L. J., Cerna C. M., Narala K. K. Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1905–1913 (1994)
- Gando S., Nishihira J., Kobayashi S., Morimoto Y., Nanzaki S., Kemmotsu O. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med.* 27, 1187-1193 (2001a)
- Gando S., Nishihira J., Kobayashi S., Morimoto Y., Matsushita M., Kemmotsu O. Systemic macrophage migration inhibitory factor release following hepatic resection. *Surg Today.* 31, 605-609. (2001b)
- Garai J., Clark J.H. Tyrosinase-like activity and estradiol binding in rat uterine nuclear extracts. *Steroids.* 57, 248-256 (1992)
- Garai J., Hummel Z., Adlercreutz H. An enzymatic activity of uterine nuclear extracts resembling to phenylpyruvate keto-enol tautomerase of macrophage migration inhibitor factor. Poster presented at the 82nd Annual Meeting of The Endocrine Society Denver, Co. June 21-24. (2001)
- Garai J., Molnar V., Varga T., Torok A., Bodis J. Macrophage migration inhibitory factor enzymatic activity of peritoneal fluid in endometriosis. *J Reprod Immunol* 58, 186 abstract No. 11.1 (O) (2003)
- Garai J., Adlercreutz H. Estrogen-inducible uterine flavonoid binding sites: Is it time to reconsider? *J Steroid Biochem* 88, 377–381 (2004)
- Garai J., Lóránd T., Molnár V. Ketone bodies affect the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor. *Life Sciences* 77, 1375-1380 (2005)
- Garai J., Molnar V., Varga T., Koppan M., Torok A., Bodis J. Endometriosis: harmful survival of an ectopic tissue. *Frontiers in Bioscience* 11, 595-619. (2006)
- Gehm B. D., McAndrews J. M., Chien P. Y., Jameson J. L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *PNAS* 94, 14138–14143 (1997)
- George M., Vaughan J. H. In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 514-521 (1962)
- Ghanim H., Aljada A., Hofmeyer D., Syed T., Mohanty P., Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* 110, 1564–1571 (2004)
- Glitsø L.V., Mazur W., Adlercreutz H., Wähälä K., Mäkelä T., Sandström B., Wahala K. Intestinal metabolism of rye lignans in pigs. *Br. J. Nutr.* 84, 429–437. (2000)
- Gregory J.L., Leech M.T., David J.R., Yang Y.H., Dacumos A., Hickey M.J. Reduced leukocyte–endothelial cell interactions in the inflamed microcirculation of macrophage migration inhibitory factor-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 50, 3023–3034 (2004)
- Hallgas B., Dobos Zs., Hollósy F., Schwab R.E., Szabó E.Z., Erős D., Idei M., Kéri Gy., Lóránd T. Characterization of lipophilicity and antiproliferative activity of E-2-arylmethylene-1-tetralones and their heteroanalogues. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 819, 283-291. (2005)
- Harborne J. B. (Szerk.): *The Flavonoids – Advances in Research.* Vol. 2, Chapman & Hall, London. (1988)

- Haziot A., Katz I., Rong G. W., Lin X. Y., Silver J., Goyert S. M. Evidence that the receptor for soluble CD14:LPS complexes may not be the putative signal-transducing molecule associated with membrane-bound CD14. *Scand J Immunol.* 46, 242-245 (1997)
- Helyes Z., Pinter E., Nemeth J., Keri G., Than M., Oroszi G., Horvath A., Szolcsanyi J. Anti-inflammatory effect of synthetic somatostatin analogues in the rat *Br J Pharmacol* 134, 1571-1579 (2001)
- Herder C., Kolb H., Koenig W., Haastert B., Müller-Scholze S., Rathmann W., Holle R., Thorand B., Wichmann H.E. Association of systemic concentrations of Macrophage Migration Inhibitory Factor with impaired glucose tolerance and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 29, 368–371 (2006)
- Hermanowski-Vosatka A., Mundt S. S., Ayala J. M., Goyal S, Hanlon WA, Czerwinski RM, Wright SD, Whitman CP. Enzymatically inactive macrophage migration inhibitory factor inhibits monocyte chemotaxis and random migration. *Biochemistry* 38, 12841–12849 (1999)
- Hirokawa J., Sakaue S., Tagami S., Kawakami Y., Sakai M., Nishi S., Nishihira J. Identification of macrophage migration inhibitory factor in adipose tissue and its induction by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun* 235, 94 –98 (1997)
- Ho S.C., Chan S. G., Yi Q., Wong E., Leung P. C. Soy intake and the maintenance of peak bone mass in Hong Kong Chinese women. *J. Bone Miner. Res.* 16, 1363–1369 (2001)
- Horn-Ross P. L., Hoggatt K. J., Lee M. M. Phytoestrogens and thyroid cancer risk: the San Francisco Bay Area thyroid cancer study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11, 43–49 (2002)
- Hudson J. D., Shoaibi M. A., Maestro R., Carnero A., Hannon G. J., Beach D. H. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J. Exp. Med.* 190, 1375–1382 (1999)
- Ichiyama H., Onodera S., Nishihira J., Ishibashi T., Nakayama T., Minami A., Yasuda K., Tohyama H. Inhibition of joint inflammation and destruction induced by anti-type II collagen antibody/ lipopolysaccharide (LPS)-induced arthritis in mice due to deletion of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Cytokine* 26, 187–194 (2004)
- Isidori A. M., Kaltsas G. A., Korbonits M., Pyle M., Gueorguiev M., Meinhardt A., Metz C., Petrovsky N., Popovic , Bucala R., Grossman A.B. Response of serum macrophage migration inhibitory factor levels to stimulation or suppression of the hypothalamo–pituitary– adrenal axis in normal subjects and patients with Cushing’s disease. *J Clin, Endocrin. Metab.* 87, 1834–1840 (2002)
- Jain S. K., McVie R., Jaramillo J. J., Chen Y. Hyperketonemia (acetoacetate) increases the oxidizability of LDL+VLDL in type-1 diabetic patients. *Free Radical Biology & Medicine* 24, 175–181 (1998)
- Jasanoff A., Wagner G., Wiley D. C. Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein Ii. *EMBO J.* 17, 6812–6818 (1998)
- Jayagopal V., Albertazzi P., Kilpatrick E. S., Howarth E. M., Jennings P. E., Hepburn D. A., Atkin S. L., Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25, 1709–1714 (2002)
- Juttner S., Bernhagen J., Metz C. N., Rollinghoff M., Bucala R., Gessner A. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF- $\alpha$ . *J. Immunol.* 161, 2383-2390 (1998)
- Kalapos M. P. On the mammalian acetone metabolism: from chemistry to clinical implications. *BBA* 1621, 122–139 (2003)
- Kaminski M. V. Jr, Neufeld H. A., Pace J. G. Effect of inflammatory and noninflammatory stress on plasma ketone bodies and free fatty acids and on glucagon and insulin in peripheral and portal blood. *Inflammation.* 3, 289-294 (1979)
- Kardinaal A. F. M., Morton M. S., Bruggemann-Rotgans I. E. M., van Beresteijn E. C. H. Phyto-estrogen excretion and rate of bone loss in postmenopausal women. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52, 850–855 (1998)
- Kariya S., Okano M., Aoji K., Kosaka M., Chikumoto E., Hattori H., Yuen K., Nishioka S., Nishioka K., Nishizaki K. Role of macrophage migration inhibitory factor in otitis media with effusion in adults. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 10, 417-422 (2003)

- Kato Y., Muto T., Tomura T., Tsumura H., Watarai H., Mikayama T., Ishizaka K., Kuroki R. The crystal structure of human glycosylation-inhibiting factor is a trimeric barrel with three 6-stranded beta-sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93, 3007-3010 (1996)
- Kats R., Collette T., Metz C. N., Akoum A., Marked elevation of macrophage migration inhibitory factor in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 78, 69-76. (2002a)
- Kats R., Metz C.N., Akoum A. Macrophage migration inhibitory factor is markedly expressed in active and early-stage endometriotic lesions. *J Clin Endocr Metab* 87, 883-889. (2002b)
- Kats R., Al-Akoum M., Guay S., Metz C., Akoum A. Cycle-dependent expression of macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium *Human Reproduction* 20, 3518-3525. (2005)
- Kelly G. E., Joannou G. E., Reeder A. Y., Nelson C., Waring M. A. The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208, 40-43 (1995)
- Kenneth D., Setchell R., Cassidy A. Dietary Isoflavones: Biological effects and relevance to human health. *J. Nutr.* 129, 758S-767S (1999)
- Kettelhut I. C., Fiers W., Goldberg A. L. The toxic effects of tumor necrosis factor in vivo and their prevention by cyclooxygenase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 84, 4273-4277 (1987)
- Kim M. K., Chung B. C., Yu V. Y., Nam J. H., Lee H. C., Huh K .B., Lim S.K., Relationships of urinary phyto-oestrogen excretion to BMD in postmenopausal women. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 56, 321-328 (2002)
- Kimura S., Suwa J., Ito B., Sato H. Development of malignant goiter by defatted soybean with iodine-free diet in rats. *Gann*; 67, 763-765 (1976)
- Kitaichi N., Kotake S., Sasamoto Y., Namba K., Matsuda A., Ogasawara K., Onoe K., Matsuda H., Nishihira J. Prominent increase of macrophage migration inhibitory factor in the sera of patients with uveitis. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 247-250 (1999)
- Kitaichi N., Kotake S., Mizue Y., Matsuda H., Onoe K., Nishihira J. Increase of macrophage migration inhibitory factor in sera of patients with iridocyclitis. *Br. J. Ophthalmol.* 84, 1423-1425 (2000)
- Kleemann R., Kapurniotu A., Frank R. W., Gessner A., Mischke R., Flieger O., Juttner S., Brunner H., Bernhagen J. Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as a thiol-protein oxidoreductase. *J. Mol. Biol.* 280, 85-102 (1998)
- Kleemann R., Kapurniotu A., Mischke R., Held J., Bernhagen J. Characterization of catalytic centre mutants of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and comparison to Cys81Ser MIF. *Eur. J. Biochem.* 261, 753-766 (1999)
- Kleemann R., Hausser A., Geiger G., Mischke R., Burger-Kentischer A., Flieger O., Johannes F. J., Roger T., Calandra T., Kapurniotu A., Grell M., Finkelmeier D, Brunner H, Bernhagen J. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature* 408, 211-216 (2000)
- Kleemann R., Bernhagen J., Ihling C. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation* 105, 1561-1566 (2002)
- Knopp J., Jezova B. D., Langer P. Partial hepatectomy alters serum hormone levels in rats. *Horm Metab Res.*, 23, 329-332 (1999)
- Knuckles B. E., DeFremery D., Kohler G. O. Coumestrol content of fractions obtained during wet processing of alfalfa. *J. Agric. Food Chem.* 24, 1177-1180 (1976)
- Kozak C. A., Adamson M. C., Buckler C. E., Segovia L., Paralkar V., Wistow G. Genomic cloning of mouse MIF (macrophage inhibitory factor) and genetic mapping of the human and mouse expressed gene and nine mouse pseudogenes. *Genomics* 27, 405-411 (1995)
- Kuiper G. G. J. M., Enmark E., Peltouhikki M., Nilsson S., Gustaffson J.-A. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5925-5930. (1996)
- Lacey D, Sampey A, Mitchell R, Bucala R, Santos L, Leech M, Morand E. Control of fibroblast-like synovioocyte proliferation by macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum.* 48, 103-109 (2003)

- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)
- Lampe J. W., Skor H. E., Li S., Wahala K., Howald W. N., Chen C. Wheat bran and soy protein feeding do not alter urinary excretion of the isoflavan equol in premenopausal women. *J. Nutr.* 131, 740-744 (2001)
- Lan H. Y., Yang N., Nikolic-Paterson D. J., Yu X. Q., Mu W., Isbel N. M., Metz C. N., Bucala R., Atkins R. C. Expression of macrophage migration inhibitory factor in human glomerulonephritis. *Kidney Int.* 57, 499-509 (2000)
- Lanza-Jacoby S., Rosato E., Braccia G., Tabares A. Altered ketone body metabolism during gram-negative sepsis in the rat. *Metabolism* 39, 1151-1157 (1990)
- Lashuel H. A., Aljabari B., Sigurdsson E. M., Metz C. N., Leng L., Callaway D. J., Bucala R. Amyloid fibril formation by macrophage migration inhibitory factor. *BBRC* 338, 973-280 (2005)
- Leask A., Stearns T. Expression of amino- and carboxyl-terminal gamma- and alpha-tubulin mutants in cultured epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 273, 2661-2668 (1998)
- Lee H. P., Gourley L., Duffy S. W., Esteve J., Lee J., Day N. E. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet* 337, 1197-1200 (1991)
- Leech M., Metz C., Santos L., Peng T., Holdsworth S. R., Bucala R., Morand E. F. Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum.* 41, 910-917 (1998)
- Leech M., Metz C., Hall P., Hutchinson P., Gianis K., Smith M., Weedon H., Holdsworth S. R., Bucala R., Morand, E.F. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum.* 42, 1601-1608 (1999)
- Leech M., Metz C., Bucala R., Morand E. F. Regulation of macrophage migration inhibitory factor by endogenous glucocorticoids in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 827-833 (2000)
- Leech M., Lacey D., Xue J. R., Santos L., Hutchinson P., Wolvetang E., David J. R., Bucala R., Morand E. F. Regulation of p53 by macrophage migration inhibitory factor (MIF) in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 1881-1889 (2003)
- Lehmann L. E., Novender U., Schroeder S., Pietsch T., von Spiegel T., Putensen C., Hoefft A., Stuber F. Plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are elevated in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* 27, 1412-1415 (2001)
- Lemay A., Dodin S., Kadri N., Jacques H., Forest J.-C., Flaxseed dietary supplement versus hormone replacement therapy in hypercholesterolemic menopausal women. *Obstet. Gynecol.* 100, 495-504 (2002)
- Leng L., Metz C. N., Fang Y., Xu J., Donnelly S., Baugh J., Delohery T., Chen Y., Mitchell R. A., Bucala R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med.* 197, 1467-1476 (2003)
- Lim G. P., Chu T., Yang F., Beech W., Frautschy S.A., Cole G.M. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J. Neurosci.* 21, 8370-8377 (2001)
- Lóránd T., Al-Nakib T.M., Prókai L. Synthesis, Antimycotic Activity and QSAR Studies of Homoisoflavanone Analogues. 212th National Meeting of the American Chemical Society, August 24-29, Orlando, FL, USA. (1996)
- Lubetsky J. B., Swope M., Dealwis C., Blake P., Lolis E. Pro-1 of macrophage migration inhibitory factor functions as a catalytic base in the phenylpyruvate tautomerase activity. *Biochemistry* 38, 7346-7354 (1999)
- Lubetsky J. B., Dios A., Han J., Aljabari B., Ruzsicska B., Mitchell R., Lolis E., Al-Abed Y. The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents. *J. Biol. Chem.* 277, 24976-24982 (2002)
- Lucas E. A., Wild R. D., Hammond L. J., Khalil D. A., Juma S., Daggy B. P., Stoecker B. J., Arjmandi B. H. Flaxseed improves lipid profile without altering biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1527-1532 (2002)
- Mahutte N. G., Matalliotakis I. M., Goumenou A. G., Koumantakis G. E., Vassiliadis S., Arici A. Elevations in peritoneal fluid macrophage migration inhibitory factor are independent of the depth of invasion or stage of endometriosis. *Fertil Steril* 82, 97-101 (2004)

- Markaverich B. M., Schauweker T. H., Gregory R. R., Varma M., Kitrell F. S., Medina D., Varma R.S. Nuclear type II site and malignant cell proliferation: Inhibition by 2,6-bisbenzylidencyclohexanones. *Cancer Res.* 52, 2482-2488 (1992)
- Markaverich B. M., Alejandro M. A. Type II [3H] estradiol binding site antagonists: inhibition of normal and malignant prostate cell growth and proliferation. *Int. J. Oncol.* 12, 1127-1135 (1998)
- Markaverich B. M., Roberts R. R., Alejandro M. A., Johnson G. A., Middleditch B. S., Clark J. H. Bioflavonoid interaction with rat uterine type II binding sites and cell growth inhibition. *J. Steroid Biochem.* 30, 71-78 (1988)
- Marshall J. C., Cook D. J., Christou N. V., Bernard G. R., Sprung C. L., Sibbald W. J. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit. Care Med.* 23, 1638-1652 (1995)
- Márton S., Ittész B., Szabó K., Tóth I., Bogár L., Molnár V., Kanizsai P., Garai J., Kőszegi T. Makrofág migráció inhibitor faktor (MIF) kinetikájának összehasonlító vizsgálata daganat miatt végzett bélrezekciót valamint májrezekciót követően. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia* 35, 26-33 (2005)
- Matsumoto, K., Kanmatsuse, K. Increased production of macrophage migration inhibitory factor by T cells in patients with IgA nephropathy. *Am. J. Nephrol.* 21, 455-464 (2001)
- Matsunaga J., Sinha D., Pannell L., Santis C., Solano F., Wistow G. J., Hearing V. J. Enzyme activity of macrophage migration inhibitory factor toward oxidized catecholamines. *J. Biol. Chem.* 274, 3268-3271 (1999a)
- Matsunaga J., Sinha D., Solano F., Santis C., Wistow G., Hearing V. Macrophage migration inhibitory factor (MIF)—its role in catecholamine metabolism. *Cell. Mol. Biol.* 45, 1035-1040 (1999b)
- McCann S.E., Moysich K.B., Freudenheim J.L., Ambrosone C.B., Shields P.G., The risk of breast cancer associated with dietary lignans differs by CYP17 genotype in women. *J. Nutr.* 132, 3036-3041 (2002)
- McCann S.E., Freudenheim J.L., Marshall J.R., Graham S. Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, Phytochemicals and Food Groups. *J. Nutr.* 133, 1937-1942 (2003)
- McCarthy P.L., Shaw J.E., Remold H.G. The role of microtubules in the response of macrophages to MIF. *Cell Immunol.* 46, 409-415 (1979)
- McInnes A., Rennick D. M. Interleukin 4 induces cultured monocytes/ macrophages to form giant multinucleated cells. *J. Exp. Med.* 167, 598-611 (1988)
- Mei J., Yeung S.S., Kung A.W. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5217-5221 (2001)
- Meinhardt B. M., Lan H. Y., Mu W., Metz C. N., Chesney J.A., Calandra T., Gemsa D., Donnelly T., Atkins R.C., Bucala R. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am. J. Pathol.* 150, 235-246 (1997)
- Meisner M., Tschakowsky K., Hutzler A, Schick C, Schuttler J. Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery. *Int. Care Med.*, 24, 680-684 (1998)
- Merz-Demlow B. E., Duncan A. M., Wangen K. E., Xu X., Carr T. P., Phipps W. R., Kurzer M. S. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1462-1469 (2000)
- Metz C. N., Bucala R. Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulation of the immune response. *Adv. Immunol.* 66, 197-223 (1997)
- Meyer-Siegler K. L., Hudson, P. B. Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases *Urology* 48, 448-452 (1996)
- Meyer-Siegler K. L., Leifheit E. C., Vera P. L. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor decreases proliferation and cytokine expression in bladder cancer cells. *BMC Cancer* 4, 34 (2004)
- Meyer-Siegler K. L., Iczkowski K. A., Vera P. L. Further evidence for increased macrophage migration inhibitory factor expression in prostate cancer *BMC Cancer* 5, 73 (2005)

- Mikulowska A., Metz C. N., Bucala R., Holmdahl R. Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice. *J. Immunol.* 158, 5514–5517 (1997)
- Mitchell R., Bacher M., Bernhagen J., Pushkarskaya T., Seldin M. F., Bucala R. Cloning and characterization of the gene for mouse macrophage migration inhibitory factor (MIF). *J. Immunol.* 154, 3863–3870 (1995)
- Mitchell R. A., Metz C. N., Peng T., Bucala R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J. Biol. Chem.* 274, 18100–18106 (1999)
- Mitchell R. A., Liao H., Chesney J., Fingerle-Rowson G., Baugh J., David J., Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 345–350 (2002)
- Molnar Z., Szakmany T., Koszegi T. Microalbuminuria and serum procalcitonin levels following oesophagectomies. *Eur. J. Anaesth.*, 17, 464–465 (2000)
- Molnar, V., Garai, J. Plant-derived anti-inflammatory compounds affect MIF tautomerase activity. *Int. Immunopharmacology* 5, 849–856 (2005)
- Morabito N., Crisafulli A., Vergara C., Gaudio A., Lasco A., Frisina N., D'Anna R., Corrado F., Pizzoleo M. A., Cincotta M., Altavilla D., Ientile R., Squadrito F. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J. Bone Miner. Res.* 17, 1904–1912 (2002)
- Morand E. F., Leech M., Weedon H., Metz C., Bucala R., Smith M. D. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: clinical correlations. *Rheumatology* 41, 558–562 (2002)
- Morand E. F., Bucala R., Leech M. Macrophage migration inhibitory factor: an emerging therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 291–299 (2003)
- Morand E. F., Leech M. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis. *Front. Biosci.* 10, 12–22. (2005)
- Morand E. F., Leech M., Bernhagen J. MIF a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 399–411 (2006)
- Morin M, Bellehumeur C, Therriault MJ, Metz C, Maheux R, Akoum A. Elevated levels of macrophage migration inhibitory factor in the peripheral blood of women with endometriosis. *Fertil Steril*;83:865–72 (2005)
- Muhlhahn, P., Bernhagen, J., Czisch, M., Georgescu, J., Renner, C., Ross, A., Bucala, R., Holak, T. A. NMR characterization of structure, backbone dynamics, and glutathione binding of the human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Protein Sci.* 5, 2095–2103 (1996)
- Murakami H., Akbar S. M., Matsui H., Onji M. Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: clinical implications and pathogenic significance. *Eur. J. Clin. Invest* 31, 337–343 (2001)
- Murakami H., Akbar S. M., Matsui H., Horiike N., Onji M. Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 128, 504–510 (2002)
- Murphy P. A. Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technol.* 34, 60–64 (1982)
- Nathan C. F., Karnovsky M. L., David J. R. Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J. Exp. Med.* 133, 1356–1376 (1971)
- Nathan, C. F., Remold, H. G., David, J. R. Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage functions. *J. Exp. Med.* 137, 275–290 (1973)
- Naughton D., Whelan M., Smith E. C., Williams R., Blake D. R., Grootveld M. An investigation of the abnormal metabolic status of synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis by high field proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *FEBS Letters* 317, 135–138 (1993)
- Neufeld H. A., Pace J. A., White E. The effect of bacterial infections on ketone concentrations in rat liver and blood and on free fatty acid concentrations in rat blood. *Metabolism* 25, 877–884 (1976)



- NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy. *JAMA* 285, 785–795 (2001)
- Niino M., Ogata A., Kikuchi S., Tashiro K., Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor in the cerebrospinal fluid of patients with conventional and optic spinal forms of multiple sclerosis and neuro-Behcet's disease. *J. Neurol. Sci.* 179, 127-131 (2000)
- Nishino T., Bernhagen J., Shiiki H., Calandra T., Dohi K., Bucala, R. Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol. Med.* 1, 781-788 (1995)
- Ogawa H., Nishihira J., Sato, Y., Kondo M., Takahashi N., Oshima T., Todo S. An antibody for macrophage migration inhibitory factor suppresses tumour growth and inhibits tumour-associated angiogenesis. *Cytokine* 12, 309-314 (2000)
- Onodera S., Tanji H., Suzuki K., Kaneda K., Mizue Y., Sagawa A. and Nishihira J. High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissues of rheumatoid joints. *Cytokine* 11, 163–167 (1999)
- Onodera S., Kaneda K., Mizue Y., Koyama Y., Fujinaga M., Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *J. Biol. Chem.* 275, 444-450 (2000)
- Onodera S., Nishihira J., Iwabuchi K., Koyama Y., Yoshida K., Tanaka S., Minami A. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. Relevance to intracellular signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 277, 7865–7874 (2002)
- Onodera S., Nishihira J., Koyama Y., Majima T., Aoki Y., Ichiyama H., Ishibashi T., Minami A. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates the expression of interleukin-8 messenger RNA in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients: common transcriptional regulatory mechanism between interleukin-8 and interleukin-1 $\beta$ . *Arthritis Rheum.* 50, 1437–1447 (2004)
- Orita M., Yamamoto S., Katayama N., Aoki M., Takayama K., Yamagiwa Y., Seki N., Suzuki H., Kurihara H., Sakashita H., Takeuchi M., Fujita S., Yamada T., Tanaka A. Coumarin and chromen-4-one analogues as tautomerase inhibitors of macrophage migration inhibitory factor: discovery and X-ray crystallography. *J. Med. Chem.* 44, 540-547 (2001)
- Orita M., Yamamoto S., Katayama N., Fujita S. Macrophage migration inhibitory factor and the discovery of tautomerase inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* 8, 1297–1317 (2002)
- Oshima S., Onodera S., Amizuka N., Li M., Irie K., Watanabe S., Koyama Y., Nishihira J., Yasuda K., Minami A. Macrophage migration inhibitory factor-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone loss. *FEBS Letters* 580, 1251-1256 (2006)
- Oyama R., Yamamoto H., Titani K. Glutamine synthetase, hemoglobin alpha-chain, and macrophage migration inhibitory factor binding to amyloid beta-protein: their identification in rat brain by a novel affinity chromatography and in Alzheimer's disease brain by immunoprecipitation. *Biochim Biophys Acta* 1479, 91–102 (2000)
- Padawer J. Induction of cellular movements in mast cells by colchicine treatment. *J. Cell Biol.* 29, 176-180 (1966)
- Paralkar V., Wistow G. Cloning the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Genomics* 19, 48-51 (1994)
- Peterson J., Dwyer J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr. Res.* 18, 1995–2019 (1998)
- Petrovsky N., Socha L., Silva D., Grossman A. B., Metz C., Bucala, R. Macrophage migration inhibitory factor exhibits a pronounced circadian rhythm relevant to its role as a glucocorticoid counter-regulator. *Immunol. Cell Biol.* 81, 137-143 (2003)
- Philo J. S., Yang T. H., LaBarre M. Re-examining the oligomerization state of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in solution. *Biophys. Chem.* 108, 77–87 (2004)
- Pick E., Abrahamer H. Blocking of macrophage migration inhibitory action by microtubular disruptive drugs. *Ints. Archs. Allergy appl. Immun.* 44, 215-220 (1973)

- Pick E., Honig S., Griffel B. The mechanism of action of soluble lymphocyte mediators. VI. Effect of Migration Inhibitory Factor (MIF) on macrophage microtubules. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 58, 149-159 (1979)
- Pietinen P., Stumpf K., Mannisto S., Kataja V., Uusitupa M., Adlercreutz H. Serum enterolactone and risk of breast cancer: a case-control study in Eastern Finland. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10, 339-344 (2001)
- Potter S., Baum J., Teng H., Stillman R., Shay N., Erdman Jr J. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1375-1379 (1998)
- Pyle M. E., Korbonits M., Gueorguiev M., Jordan S., Kola B., Morris D. G., Meinhardt A., Powell M. P., Claret F. X., Zhang Q., Metz C., Bucala R., Grossman, A. B. Macrophage migration inhibitory factor expression is increased in pituitary adenoma cell nuclei *J Endocrinol* 176, 103-110 (2003)
- Rahman I., Chida A., Yang S., auter M., Kirkham P. Curcumin restores glucocorticoid function and inhibits oxidant-mediated IL-8 release in oxidant stressed monocytes/macrophages. *SFRBM 12th annual meeting S52-53/123* (2005)
- Ranganna S., Govindarajan V. ., Raman K.V. R. Citrus fruits. Part II. Chemistry, technology and quality evaluation. *B. Technol. CRC Crit. Rev.* 19, 1-98 (1983)
- Reinli K., Block G. Phytoestrogen content of foods - A compendium of literature values. *Nutr Cancer* 26, 123-148 (1996)
- Rice-Evans C. A., Diplock A. Current status of antioxidant therapy. *Free radic. Biol. Med.* 15, 77-96 (1993)
- Rice-Evans C. A., Packer L. *Flavonoids in health and disease.* New York: Marcel Dekker, Inc. (1998)
- Rich A. R. Lewis M. R. Migration of neutrophils and macrophages. *Bull. John Hopkins Hosp.* 81, 115-131 (1932)
- Riedemann N. C., Guo R. F., Ward P. A. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat. Med.* 9, 517-524 (2003)
- Roger T., David J., Glauser M. P., Calandra T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 414: 920-924 (2001)
- Roger T., Chanson A. L., Knaup-Reymond M., Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor promotes innate immune responses by suppressing glucocorticoid-induced expression of mitogenactivated protein kinase phosphatase-1. *Eur. J. Immunol.* 35, 3405-3413 (2005)
- Rosengren E., Bucala R., Aman P., Jacobsson L., Odh G., Metz C. N., Rorsman H. The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol. Med.* 2, 143-149 (1996)
- Rosengren E., Aman P., Thelin S., Hansson C., Ahlfors S., Bjoerk P., Jacobsson L., Rorsman H. The macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a phenylpyruvate tautomerase. *FEBS Lett.* 417, 85-88 (1997)
- Rossi A. G., Haslett C., Hirani N., Greening A. P., Rahman I., Metz C. N., Bucala R., Donnelly S. C. Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. *J. Clin. Invest* 101, 2869-2874 (1998)
- Rossiter R. C., Beck A. B. Physiological and ecological studies on the estrogenic isoflavones in subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) I. Effects of temperature. *Aust. J. Agric. Res.* 17, 29-37 (1966)
- Rowland I. R., Wisemen H., Sanders T. A. B., Adlercreutz H., Bowey E. A. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr. Cancer* 36, 27-32 (2000)
- Russel R. J., Wilkinson P. C., Sless F., Parrott D. M. N. Chemotaxis of lymphoblasts. *Nature*, 256, 646-648 (1975)
- Sakai Y., Masamune A., Satoh A., Nishihira J., Yamagiwa T., Shimosegawa T. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 124, 725-736 (2003)
- Sakaue S., Nishihira J., Hirokawa J., Yoshimura H., Honda T., Aoki K., Tagami S., Kawakami Y. Regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression by glucose and insulin in adipocytes in vitro. *Mol. Med.* 5, 361-371 (1999)

- Sampey A. V., Hall P. H., Mitchell R. A., Metz C. N., Morand E. F. Regulation of synoviocyte phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum.* 44, 1273–1280 (2001)
- Sanders T. A. B., Dean T. S., Grainger D., Miller G. J., Wiseman H. Moderate intakes of intact soy protein rich in isoflavones compared with ethanol-extracted soy protein increase HDL but do not influence transforming growth factor beta(1) concentrations and hemostatic risk factors for coronary heart disease in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 373–377 (2002)
- Sant A. J., Cullen S. E., Schwartz B. D. Biosynthetic relationships of the chondroitin sulfate proteoglycan with Ia and invariant chain glycoproteins. *J. Immunol.* 135, 416–422 (1985)
- Santos L., Hall P., Metz C., Bucala R., Morand E. F. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clin. Exp. Immunol.* 123, 309–314 (2001)
- Santos L., Lacey D. C., Yang Y., Leech M., Morand E. F. Activation of synovial cell p38 MAP kinase by macrophage migration inhibitory factor (MIF). *J. Rheumatol.* 31, 1038–1043 (2004)
- Sato N., Shimizu H., Shirmomura Y., Suwa K., Mori M., Kobayashi I. Mechanism of inhibitory action of ketone bodies on the production of reactive oxygen intermediates (ROIS) by polymorphonuclear leukocytes. *Life Sci.* 51, 113–118 (1992)
- Selvi E., Tripodi S. A., Catenaccio M., Lorenzini S., Chindamo D., Manganelli S., Romagnoli R., Ietta F., Paulesu L., Miracco C., Cintonino M., Marcolongo R. Expression of macrophage migration inhibitory factor in diffuse systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 62, 460–464 (2003)
- Senter P. D., Al-Abed Y., Metz C. N., Benigni F., Mitchell R. A., Chesney J., Han J., Gartner C. G., Nelson S. D., Todaro G. J., Bucala R. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor (MIF) tautomerase and biological activities by acetaminophen metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 144–149 (2002)
- Setchell K. D., Lawson A. M., Borriello S. P., Harkness R., Gordon H., Morgan D. M., Kirk D. N., Adlercreutz H., Anderson L.C., Axelson M., Lignan formation in man—microbial involvement and possible roles in relation to cancer. *Lancet* 2, 4–7 (1981)
- Setchell K. D., Brown N. M., Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J. Nutr.* 132, 3577–3584 (2002)
- Shelanski M. L., Gaskin F., Cantor C. R. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 765–768 (1973)
- Shih H., Deng L., Carrera C. J., Adachi S., Cottam H. B., Carson D. A. Rational design, synthesis and structure–activity relationships of antitumor (E)-2-benzylidene-1-tetralones and (E)-2-benzylidene-1-indanones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, 487–490 (2000)
- Shimizu T., Abe R., Nakamura H., Ohkawara A., Suzuki M., Nishihira J. High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 751–758 (1999)
- Shimizu T., Abe R., Ohkawara A., Mizue Y., Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor is an essential immunoregulatory cytokine in atopic dermatitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 173–178 (1997)
- Simelyte E., Rosengren S., Boyle D. L., Corr M., Green D. R., Firestein G. S. Regulation of arthritis by p53: critical role of adaptive immunity. *Arthritis Rheum.* 52, 1876–1884 (2005)
- Siriworn T., Wrolstad R. E. Polyphenolic composition of marion and evergreen blackberries. *Journal of Food Science* 69, 233–240 (2004)
- Sjögren F., Groth O., Anderson C. Acetone has anti-inflammatory effects on experimental contact reactions. *Contact Dermatitis* 41, 22–29 (1999)
- Skurk T., Herder C., Kraft I., Müller-Scholze S., Hauner H., Kolb H. Production and release of macrophage migration inhibitory factor from human adipocytes. *Endocrinology* 146, 1006–1011 (2005)
- Smolen, J. S., Steiner, G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nature Rev. Drug Discov.* 2, 473–488 (2003)
- Son H. Y., Nishikawa A., Ikeda T. Lack of effect of soy isoflavone on thyroid hyperplasia in rats receiving an iodine-deficient diet. *Jpn. J. Cancer Res.* 92, 103–108 (2001)

- Sharma R. C. Curcumin - a modern drug. *Indian Spices* 30, 21-25 (1993)
- Stamps S. L., Fitzgerald M. C., Whitman C. P. Characterization of the role of the amino-terminal proline in the enzymatic activity catalyzed by macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry* 37, 10195–10202 (1998)
- Steinhoff M., Meinhardt A., Steinhoff A., Gemesa D., Bucala R., Bacher M. Evidence for a role of macrophage migration inhibitory factor in psoriatic skin disease. *Br. J. Dermatol.* 141, 1061-1066 (1999)
- Subramanya H. S., Roper D. I., Dauter Z., Dodson E. J., Davies G. J., Wilson K. S., Wigley D. B. Enzymatic ketonization of 2-hydroxybutyrate: specificity and mechanism investigated by the crystal structures of two isomerases. *Biochemistry* 35, 792-802 (1996)
- Sugimoto H., Suzuki M., Nakagawa A., Tanaka I., Fujinaga M., Nishihira J. Crystallization of rat liver macrophage migration inhibitory factor for MAD analysis. *J. Struct. Biol.* 115, 331–334 (1995)
- Sugimoto H., Suzuki M., Nakagawa A., Tanaka I., Nishihira J. Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor from human lymphocyte at 2.1 Å resolution. *FEBS Lett.* 389, 145-148 (1996)
- Sugimoto H., Taniguchi M., Nakagawa A., Tanaka I., Suzuki M., Nishihira J. Crystallization and preliminary X-ray analysis of human D-dopachrome tautomerase. *J. Struct. Biol.* 120, 105-108 (1997)
- Sun H. W., Bernhagen J., Bucala R., Lolis E. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5191–5196 (1996)
- Suriyasathaporn W., Daemen A. J. J. M., Nordhuizen-Stassen E. N., Dieleman S. J., Nielen M., Schukken Y. H.,  $\beta$ -Hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 68, 177–186 (1999)
- Suzuki, H., Kanagawa, H., Nishihira, J. Evidence for the presence of macrophage migration inhibitory factor in murine reproductive organs and early embryos. *Immunol. Lett.* 51, 141-147 (1996a)
- Suzuki M., Sugimoto H., Nakagawa A., Tanaka I., Nishihira J., Sakai M. Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver. *Nat. Struct. Biol.* 3, 259–266 (1996b)
- Swope M., Sun H. W., Blake P. R., Lolis E. Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. *EMBO J.* 17, 3534-3541 (1998)
- Takahashi N., Nishihira J., Sato Y., Kondo M., Ogawa H., Ohshima T., Une Y., Todo S. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol. Med.* 4, 707-714 (1998)
- Taylor A. B., Johnson W. H. Jr, Czerwinski R. M., Li H. S., Hackert M. L., Whitman C.P. Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor complexed with (E)-2-fluoro-p-hydroxycinnamate at 1.8 Å resolution: implications for enzymatic catalysis and inhibition. *Biochemistry* 38, 7444-7452 (1999)
- Teede H. J., Dalais F. S., Kotsopoulos D., Liang Y. L., Davis S., McGrath B. P. Dietary soy has both beneficial and potentially adverse cardiovascular effects: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 3053–3060 (2001)
- Thiele M., Bernhagen, J. Link between macrophage migration inhibitory factor and cellular redox regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 1234–1248 (2005)
- Thurman G. B., Braude I. A., Gray P. W., Oldham R. K., Stevenson H. C. MIF-like activity of natural and recombinant human interferon-gamma and their neutralization by monoclonal antibody. *J. Immunol.* 134, 305-309 (1985)
- Vera P. L., Iczkowski K. A., Leng L., Bucala R., Meyer-Siegler K. L. Macrophage migration inhibitory factor is released as a complex with alpha1-inhibitor-3 in the intraluminal fluid during bladder inflammation in the rat. *J. Urol.* 174, 338-343 (2005)
- Vozarova B., Stefan N., Hanson R., Lindsay R. S., Bogardus C., Tataranni P. A., Metz C., Bucala R. Plasma concentrations of macrophage migration inhibitory factor are elevated in Pima Indians compared to Caucasians and are associated with insulin resistance. *Diabetologia* 45, 1739–1741 (2002)
- Wada S., Kudo T., Kudo M., Sakuragi N., Hareyama H., Nishihira J., Fujimoto S. Induction of macrophage migration inhibitory factor in human ovary by human chorionic gonadotrophin. *Hum Reprod* 14, 395-399 (1999)

- Waeber G., Calandra T., Roduit R., Haefliger J. A., Bonny C., Thompson N., Thorens B., Temler E., Meinhardt A., Bacher M., Metz C.N., Nicod P., Bucala R. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet  $\beta$  cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4782–4787 (1997)
- Waeber G., Thompson N., Chautard T., Steinmann M., Nicod P., Pralong F. P., Calandra T., Gaillard R. C. Transcriptional activation of the macrophage migration-inhibitory factor gene by the corticotropin-releasing factor is mediated by the cyclic adenosine 3',5'- monophosphate responsive element-binding protein CREB in pituitary cells. *Mol. Endocrinol.* 12, 698-705 (1998)
- Wang G. S., Kuan S., Francis O. J., Ware G. M., Carman A. S. A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *J. Agric. Food Chem.* 38, 185–190 (1990)
- Wang L., Das H., Kamath A., Li L., Bukowski J. F. Human 2V  $\delta$  2T cells augment MIF secretion and counteract the inhibitory effect of glucocorticoids on IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  production. *J. Immunol.* 168, 4889-4896 (2002)
- Wangen K. E., Duncan A. M., Xu X., Kurzer M. S. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 225–231 (2001)
- Washburn S., Burke G. L., Morgan T., Anthony M. Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. *Menopause* 6, 7–13 (1999)
- Watarai H., Suzuki N. Keto–enol tautomerization rates of acetylacetone in mixed aqueous media. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 36, 1815–1820 (1974)
- Weisenberg R. Invited review: the role of nucleotide triphosphate in actin and tubulin assembly and function. *Cell Motil.* 1, 485-497 (1981)
- Weiser W. Y., Temple P. A., Witek-Giannotti J. S., Remold H. G., Clark S.C., David J. R. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A* 86, 7522-7526 (1989)
- Wiley R. E., Cwiartka M., Alvarez D., Mackenzie D. C., Johnson J. R., Goncharova S., Lundblad L., Jordana M. Transient corticosteroid treatment permanently amplifies the Th2 response in a murine model of asthma. *J. Immunol.* 172, 4995–5005 (2004)
- Winyard P. G., Tatzber F., Esterbauer H., Kus M. L., Blake D. R., Morris C. J., Presence of foam cells containing oxidised low density lipoprotein in the synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheumatic Diseases* 52, 677–680 (1993)
- Wraight C. J., van Endert P., Moller P., Lipp J., Ling N. R., MacLennan I. C., Koch N., Moldenhauer G. Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface. *J. Biol. Chem.* 265, 5787-5792 (1990)
- Wu T. W., Fung K. P., Zeng L. H., Wu J., Hempel A., Grey A. A., Camerman N. Molecular-properties and myocardial salvage effects of morin hydrate. *Biochem. Pharmacol.* 49, 537-543 (1995)
- Xu D., McSorley S. J., Tetley L., Chatfield S., Dougan G., Chan W. L., Satoskar A., David J. R., Liew F. Y. Protective effect on Leishmania major infection of migration inhibitory factor, TNF-alpha, and IFN-gamma administered orally via attenuated Salmonella typhimurium. *J. Immunol.* 160, 1285-1289 (1998)
- Yabunaka N., Nishihira J., Mizue Y., Tsuji M., Kumagai M., Ohtsuka Y., Imamura M., Asaka M. Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23, 256–258 (2002)
- Yamada G., Shijubo N., Takagi-Takahashi Y., Nishihira J., Mizue Y., Kikuchi K., Abe S. Elevated levels of serum macrophage migration inhibitory factor in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin. Immunol.* 104, 123-127 (2002)
- Yang Y. B., Degranpre P., Kharfi A., Akoum A. Identification of macrophage migration inhibitory factor as a potent endothelial cell growth-promoting agent released by ectopic human endometrial cells. *J. Clin. Endocr. Metab.* 85, 4721-4727 (2000)
- Zeng F. Y., Weiser W. Y., Kratzin H., Stahl B., Karas M., Gabius H. J. The major binding protein of the interferon antagonist sarcolectin in human placenta is a macrophage migration inhibitory factor. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 74-80 (1993)

Zhang X., Bucala R. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor (MIF) tautomerase activity by dopachrome analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 3193-3198 (1999)

Zhang M., Aman P., Grubb A., Panagopoulos I., Hindemith A., Rosengren E., Rorsman H. Cloning and sequencing of a cDNA encoding rat D-dopachrome tautomerase. *FEBS Lett.* 373, 203-206 (1995)

Zhu Q. J., Huang Y., Chen Z. Y. Interaction between flavonoids and alpha-tocopherol in human low density lipoprotein. *J. Nutr. Biochem* 11, 14-21 (2000)

## 10 A dolgozat témáját adó publikációk listája

### 10.1 Közlemények

1. Garai János, Világi Szabolcs, Répásy István, Verzár Zsófia, **Molnár Valéria**, Bódis József. Kivihető-e a teljes szója alapú táplálék beépítése a magyar menopauzás populáció érendjébe, Magyar Nőorvosok Lapja 67, 205-210 (2004)
2. **Valéria Molnár**, János Garai. Plant-derived anti-inflammatory compounds affect MIF tautomerase activity. International Immunopharmacology 5(5), 849-856 (2005). IF(2003): 2,203; IF(2004):1,827
3. János Garai, Tamás Lóránd, **Valéria Molnár**: Ketone bodies affect the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor. Life Sciences, 77(12), 1375-1380, (2005), IF(2003): 1,944; IF(2004): 2,158
4. Márton Sándor, Ittész Balázs, Szabó Katalin, Tóth Ildikó, Bogár Lajos, **Molnár Valéria**, Kanizsai Péter, Garai János, Kőszegi Tamás. Makrofág migráció inhibitor faktor (MIF) kinetikájának összehasonlító vizsgálata daganat miatt végzett bélrezekciót valamint májrezekciót követően. Aneszteziológia és Intenzív Terápia, 35(3) 26-33, (2005)
5. János Garai, **Valéria Molnár**, Tamás Varga, Miklós Koppán, Attila Török, József Bódis. Endometriosis: harmful survival of an ectopic tissue. Frontiers in Bioscience 11, 595-619, (2006) IF(2003): 3,603; IF(2004):3,226
6. János Garai, **Valéria Molnár**, Tamás Lóránd. A novel class of small molecular inhibitors of MIF tautomerase with antiinflammatory potential:  $\alpha,\beta$ -unsaturated cyclic ketones (Közlésre előkészítve)
7. **Valéria Molnár**, Hajnalka Ábrahám, László Seress, János Garai. Could MIF and microtubule represent a functional unit? (Kézirat előkészítés alatt)

### 10.2 Idézhető absztraktok

1. Garai J., **Molnár V.**, Varga T., Török A., Bódis J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) enzymatic activity of peritoneal fluid in endometriosis Journal of Reproductive Immunology 58 103,/187 Topic 11: Autoimmunity in reproduction 11.1 (O) (2003) IF: 2,379
2. Márton S., Ittész B., Szabó K., Bogár L., **Molnár V.**, Garai J., Kőszegi T. Makrofág inhibitor faktor (MIF) kinetikájának vizsgálata kiterjesztett hasi műtéteket követően. / Aneszteziológia és Intenzív Terápia: 34:(Szuppl. 2): 28, (2004).

3. Garai J., **Molnár V.**, Gabrieli P., Vigh E. The enzymatic activity of MIF cytokine might functionally contribute to its activation mechanisms, *Acta Physiologica Hungarica*, Vol 91, No. 3-4, 297; (2004)
4. **Molnár V.**, Garai J., Lóránd T. The enzymatic activity of MIF a possible target for anti-inflammatory molecules? *Acta Physiologica Hungarica* Vol 91, No. 3-4, 334; (2004)
5. Márton S., **Molnár V.**, Tóth I., Ittész B., Kanizsai P., Garai J., Kőszegi T., Bogár L. Comparative analysis of the kinetics of inflammatory markers. *Intensive Care Medicine* 31 Suppl. 1, S114, (2005) IF(2004): 3,034
6. Garai J., **Molnár V.**, Zábó K., Schmidt E., Répásy I., Világi Sz., Hock M., Bódis J.: Dietary intervention in menopausal osteoporosis prevention. „Soy & Health 2004”-Clinical Evidence, *Dietetic Applications*: Eds: Koen Descheemaeker & Ignace Debruyne 186-187, (2005)
7. **Molnár V.**, Garai J. Enzyme activity of macrophage migration inhibitory factor (MIF). Inhibitory effect of plant-derived anti-inflammatory compounds. *FEBS Journal* 272 (s1), D3-020P, (2005) IF(2004): 3,26
8. Garai J., **Molnár V.**, Varga T., Török A., Bódis J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF). Enzymatic activity of peritoneal fluids in endometriosis. *FEBS Journal* 272 (s1), D3-014P, (2005) IF(2004): 3,26
9. **Molnár V.**, Garai J., Hock M., Répásy I., Schmidt E., Világi Sz., Zábó K., Bódis J. Postmenopausal osteoporosis prevention with phytoestrogen biscuits. *Osteoporosis International* 17 (s2): S19–S231 (P508SA) (2006) IF(2004): 2,954

## 10.3 Konferencia előadások, poszterek listája

### 10.3.1 Előadások

1. **Molnár Valéria**, Garai János. Egy gyulladáshoz kötött citokin enzimaktivitása. PAB Sejtbiológiai Munkabizottságának Doktorandusz Szimpóziuma, 2003. január 8. Pécs
2. **Molnár Valéria**, Garai János. A rheumatoid arthritis és az osteoporosis kapcsolata. Magyar Menopausa Társaság 5. Országos Kongresszusa, 2003. június 12-14. Balatonfüred
3. **Molnár Valéria**, Garai János. A komplementer medicina helye és lehetőségei a menopausális ellátásban. A Magyar Nőorvos Társaság Dél-nyugati Magyarországi Szekciójának V. Kongresszusa, 2003. szeptember 26-27. Nagykanizsa- Zalakaros
4. Márton Sándor, Ittész Balázs, Szabó Katalin, Bogár Lajos, **Molnár Valéria**, Garai János, Kőszegi Tamás. Makrofág migráció inhibitor faktor (MIF) kinetikájának összehasonlító vizsgálata daganat miatt végzett bélrezekcióval valamint májrezekcióval követően. Magyar Aneszteziológiai és Intenzívterápiás Társaság XXIV. Nemzetközi Kongresszusa, 2004. május 27-29. Eger



5. Garai János, **Molnár Valéria**, Gabrieli Piroska, Vigh Éva. A MIF citokin enzimaktivitásának egyes funkciói hozzájárulhatnak a hatásmechanizmushoz. Magyar Élettani Társaság LXVIII. Vándorgyűlése, 2004. június 7-9. Debrecen
6. **Molnár Valéria**, Bódis József, Zámbó Katalin, Schmidt Erzsébet, Hock Márta, Répásy István, Világi Szabolcs, Garai János. Diétás intervenció szerepe az osteoporosis prevencióban. Magyar Táplálkozástudományi társaság XXXIX. Vándorgyűlése, 2004. október 28-30. Hajdúszoboszló
7. **Molnár Valéria**, Garai János, Lóránd Tamás. Gyulladásgátló növényi hatóanyagok befolyásolják a MIF cytokin enzimaktivitását. Magyar Táplálkozástudományi társaság XXXIX. Vándorgyűlése, 2004. október 28-30. Hajdúszoboszló
8. János Garai, **Valéria Molnár**, Katalin Zámbó, Erzsébet Schmidt, István Répásy, Szabolcs Világi, József Bódis. Feasibility of intervention with dietary soy and physiotherapy for menopausal osteoporosis prevention. Phytohealth Second Open Plenary Meeting, Hersonissos-Heraklion, 26-30th October 2004. Crete, Greece
9. János Garai, **Valéria Molnár**, Tamás Varga, Attila Török, József Bódis. Dysfunctional immune surveillance in endometriosis and ageing. Possible common roles for the cytokine MIF? DG RTD Workshop, 11-14th December 2004, Brussels, Belgium
10. **Molnár Valéria**, Gabrieli Piroska, Németh Edit, Schumacher Edit, Vigh Éva, Garai János. Növényi fenolok és poifenolok hatása a Makrofág migráció inhibitor faktor (MIF) enzimaktivitására Magyar Élettani Társaság LXIX. Vándorgyűlése, 2005. június 2-4. Budapest
11. **Valéria Molnár**, János Garai, Dániel Erős, László Órfi, Tamás Lóránd: 2-Arylidencycloalkanones as new possible ligands with tautomerase inhibitor potency. 2nd Bioorganic Chemistry Meeting, 23-24th June 2005, Budapest, Hun

### 10.3.2 Poszterek

1. Garai J., **Molnár V.**, Varga T., Török A, Bódis J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) enzymatic activity of peritoneal fluid in endometriosis. Magyar Élettani Társaság LXVII. Vándorgyűlése, 2003. június 2-4. Pécs
2. Garai J., **Molnár V.**, Varga T., Török A, Bódis J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) enzymatic activity of peritoneal fluid in endometriosis. Hippokraton Congress on Reproductive Immunology, 4-6th June 2003. Rhodos, Greece
3. **Molnár V.**, Garai J., Gyulladásgátló növényi hatóanyagok befolyásolják a MIF cytokin enzim-aktivitását. Magyar Élettani Társaság LXVII. Vándorgyűlése, 2003. június 2-4. Pécs
4. **Molnár V**, Bódis J., Zámbó K., Schmidt E., Hock M, Répásy I., Világi Sz., Garai J. Diétás intervenció szerepe az osteoporosis prevencióban. Magyar

Menopausa Társaság 5. Országos Kongresszusa, 2003. június 12-14.  
Balatonfüred I. Díj

5. **Molnár V.**, Garai J. Egy cytokin, mint a rheuma terápiájának lehetséges célpontja. „Tavaszi Szél” Konferencia, 2003. május 19-22. Sopron
6. **Molnár V.**, Garai J., Lóránd T. A MIF cytokin enzimaktivitása: gyulladásgátló molekulák lehetséges támadáspontja? Magyar Élettani Társaság LXVIII. Vándorgyűlése, 2004. június 7-9. Debrecen
7. Lóránd T., Garai J., **Molnár V.**, Erős D., Örfi L. Arylidene-cycloalkanones with tautomerase inhibitor potency. Twelfth FECHM (Federation of European Chemical Societies) Conference on Heterocycles in Bio-organic Chemistry, 20-24th June, 2004 Siena, Italy
8. Garai J., **Molnár V.**, Plant-derived anti-inflammatory compounds Affect MIF tautomerase activity. Inaugural COST 926 Conference, 30th September-1st October, 2004 Budapest, Hungary
9. **Molnár V.**, Garai J., Zámbo K., Schmidt E., Répásy I., Világi S., Hock M., Bódis J. Dietary intervention in menopausal osteoporosis prevention. Inaugural COST 926 Conference, 30th September-1st October, 2004 Budapest, Hungary
10. Vigh É., Gabrieli P., Schumacher E., **Molnár V.**, Garai J. Gyulladásgátló molekulák hatása a migráció inhibitor faktor enzimaktivitására és a tubulin polimerizációra. Magyar Élettani Társaság LXIX. Vándorgyűlése, 2005. június 2-4. Budapest
11. **Molnár V.**, Bódis J., Zámbo K., Schmidt E., Hock M., Répásy I., Világi Sz., Garai J. Osteoporosis prevention with phytoestrogens in the menopause. Magyar Menopausa Társaság VI. Országos Kongresszusa, 2005. június 9-11. Siófok
12. **Molnár V.**, Garai J. Enzyme activity of macrophage migration inhibitory factor (MIF). Inhibitory effect of plant-derived anti-inflammatory compounds. 30th FEBS Congress - 9th IUBMB Conference, 2nd-7th July, 2005 Budapest, Hungary
13. Garai J., **Molnár V.**, Erős D., Örfi L., Lóránd T. 2-Arylidenebenzocycloalkanones with tautomerase inhibitor potency. 13th FECHM Conference on Heterocycles in Bioorganic Chemistry, 28-31st May, 2006. Sopron, Hungary
14. **Molnár V.**, Garai J., Hock M., Répásy I., Schmidt E., Világi Sz., Zámbo K., Bódis J. Postmenopausal osteoporosis prevention with phytoestrogen biscuits. International Osteoporosis Foundation (IOF) World Congress on Osteoporosis, June 2-6, 2006. Toronto, Canada

## 11 Köszönetnyilvánítás

Őszinte hálával és köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Garai Jánosnak, aki kísérletes munkám és a dolgozat elkészítése során elméleti és gyakorlati tanácsaival mindig mögöttem állt.

Hálával tartozom asszisztensnőinknek Girán Juditnak és Szommer Zsuzsanna Dalmának a mindig kész technikai segítségnyújtásukért, továbbá a Kórélettani és Gerontológiai Intézet valamennyi munkatársának lelkes támogatásukért. Külön köszönet illeti Dr. Soós Szilviát, kinek baráti támogatására mindig bizton számíhattam. Külön köszönet illeti munkacsoportunk TDK hallgatóit, nevezetesen Fónagy Esztert, Gabrieli Piroskát, Németh Editet, Schumacher Editet és Vigh Évát, akik szorgalmasan bekapcsolódtak munkánkba.

Nagyon köszönöm Dr. Szelényi Zoltán professzor úrnak segítő támogatását és programvezetői munkáját, valamint Dr. Székely Miklós professzor úr biztatását és mindkettejük jelen dolgozatomhoz fűzött megfontolandó észrevételeit.

A Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetből nagyon köszönöm Dr. Lóránd Tamásnak a kémiai vegyületek szintézisét, szerkezetük részletes, és mindig türelmes magyarázását és a dolgozat kémiai részének többszöri, lelkiismeretes átnézésében nyújtott segítségét.

Ezúton is szeretném köszönetemet kifejezni a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetből Dr. Helyes Zsuzsannának, hogy tanácsaival és folyamatos irányításával lehetővé tette, hogy vizsgálataim in vivo kísérletekre is kiterjedhessenek és dolgozatom e fejezetét gyorsan, és részletesen átnézte. Dr. Szabó Árpád PhD. hallgatónak az állatkísérletes tevékenységhez nyújtott gyakorlati segítségét, továbbá külön köszönet illeti Sándor Katalin PhD. hallgató önzetlen és fáradhatatlan munkáját, mely révén terhésem alatt tovább folytathatnak a kiegészítő kísérletek.

A Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumból hálával tartozom Dr. Seress László professzornak és Dr. Ábrahám Hajnalkának a morfológiai vizsgálatok során kapott szakmai irányításért, támogatásért, dolgozatom e fejezetének alapos átolvasásáért és javításáért. Továbbá Papp Emesének, Dr. Lórándné Misley Juditnak és Domján Gáborné, Marcsinak a módszerek kivitelezésében nyújtott technikai segítségekért, és Belvárác Andrásnak a fény- és elektronmikroszkópos képek kidolgozásáért.

Hálával tartozom Dr. Hermann Adlercreutz professzornak, a Folkhälsan Research Center, Institute for Preventive Medicine, Nutrition, and Cancer; Department of Clinical

Chemistry; University of Helsinki igazgatójának, és Adile Samaletdinnek, hogy diákkörösként bevezetett a DELFIA mérés rejtelseibe.

Ezúton is nagyon köszönöm Dr. Bódis József professzornak a Baranya Megyei Kórház Szülészeti-Nőgyógyászati Osztály vezetőjének, valamint Dr. Czirják László professzornak az Immunológiai és Reumatológiai Klinika igazgatójának, és dr. Bogár Lajos professzornak az Anaesthesiológiai és Intenzív Therápiás Intézet igazgatójának, hogy a humán mintákat rendelkezésemre bocsátották. Ez utóbbi intézetből külön köszönöm Dr. Márton Sándor kooperatív munkáját.

Köszönettel tartozom Dr. Kocsis Bélának az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetből a készített lipopoliszacharidokért; a szabadszentkirályi vágóhíd munkatársainak a sertésagyakért; és a Biofizikai-, az Orvosi Kémiai és Biokémiai-, valamint az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetnek a mérési lehetőségek biztosításáért.

Az Egészségügyi Informatikai Központból szeretném külön megköszönni Monostori Attila állandó segítségnyújtását, aki az informatika hálózati lehetőségeit kiaknázva nagymértékben megkönnyítette laboratóriumunk munkáját.

Az Orvostudományi és Egészségtudományi Centrum Könyvtár dolgozói közül külön köszönet illeti Martos Veronikát, aki dolgozatom kiterjedt irodalmi háttéréhez biztosította a sok esetben csak körülményesen megszerezhető cikkeket.

Hálásan köszönöm egyetemünk PhD Irodájából Kis-Gadóné Wenczler Mária jó tanácsait és mindig napra kész segítségét, mellyel hatékonyan egyengeti utamat a védelem felé.

Ugyancsak őszinte köszönettel tartozom a MiniComp Kft. munkatársának, Szakács Józsefnek, aki diákkörös koromtól segített a konferenciákra való felkészülésben mind az előadások, mind a - nem egyszer díjazott - poszterek elkészítésében, valamint jelen dolgozat színvonalának emelésében. Ugyancsak köszönet illeti a MiniComp Kft. ügyvezető igazgatóját, Balogh Zoltánt is, aki prezentációim nagy részének anyagi háttérét biztosította.

Végül, de nem utolsó sorban nagyon köszönöm férjem, édesanyám és keresztszüleim szeretetét, türelmét, megértését, szüntelen biztatását és a dolgozat elkészítéséhez az általuk biztosított nyugodt háttérrel.