

**Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**EGY POTENCIÁLIS ANTIINFLAMMATORIKUS CÉLPONT:  
A MAKROFÁG MIGRÁCIÓ INHIBITOR FAKTOR ENZIMATIKUS AKTIVITÁSA**

**Bíróné dr. Molnár Valéria**

Doktori Iskola vezetője: Dr. Szolcsányi János akadémikus

Programvezető: Dr. Szelényi Zoltán

Témavezető: Dr. Garai János

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Kóréletani és Gerontológiai Intézet, Pécs

2006

## ELMÉLETI HÁTTÉR

A makrofág migráció inhibitor faktor (MIF) volt az első, *in vivo* kísérletekkel igazolhatóan nem immunglobulin szerkezetű immunmediátor. 1966-ban 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 képződési helye ismert, mégis nehéz a MIF-et klasszifikálni, hiszen a citokin funkció mellett rendelkezik hormonokra és enzimekre jellemző tulajdonságokkal is.

A humán MIF monomer 114 aminosavból áll, molekulásúlya 12,4 kDa. Háromdimenziós szerkezetét röntgen diffrakciós analízissel írták le. A MIF három azonos alegységből felépülő homotrimer molekula (Sun és mtsai, 1996; Suzuki és mtsai, 1996). Szerkezete nem mutat semmiféle hasonlóságot sem a többi citokinnel, sem a hipofizishormonokkal, de néhány prokarióta enzimhez nem csak szerkezetileg, hanem valamelyest szekvencia homológia tekintetében is hasonló. A MIF gyakorlatilag az egész szervezetben megtalálható, az immunrendszer sejtjeitől kezdve, a hipofízis kortikotrop sejtjein át, az endothel sejtekig (Calandra és Roger, 2003). 3–5ng/ml koncentrációban, a vérben is megtalálható (Metz és Bucala, 1997).

A MIF extracellulárisan kötődve, receptor-mediált jelátvivő utakon keresztül és - endocytosisal a sejtbe jutva- intracelluláris kölcsönhatások révén is szabályozza a sejtaktivitást. Bár hatásmechanizmusa még nem teljesen tisztázott, más proinflammatorikus proteinekhez hasonlóan képes synoviocytákban aktiválni a mitogén-aktivált protein kinázokat (MAPK), így az extracelluláris szignál-reguláló kinázt (ERK) és a p38 MAPK-t (Onodera és mtsai, 2004; Santos és mtsai, 2004). Jelenleg a MIF az egyetlen citokin, mely közvetlenül gátolja a p53 expresszióját és funkcióját (Hudson és mtsai, 1999; Mitchell és mtsai, 2002; Leech és mtsai, 2003; Lacey és mtsai, 2003).

Bár a MIF-et a proinflammatorikus citokinekhez sorolják, rendelkezik néhány, a citokinektől eltérő tulajdonsággal is. Például: több évtized intenzív kutatásai ellenére sem találták meg a MIF *bona fide* receptorát. A MIF endokrin faktor is, mert lipopoliszacharid (LPS) injekció hatására a hipofízis kortikotrop sejtjei is szecernálják (Bernhagen és mtsai, 1993). A szérumban MIF koncentrációja a kortizoléhoz hasonló cirkadián ritmust mutat (Petrovsky és mtsai, 2003). Annak ellenére, hogy a citokineket a glükokortikoidok általában serkentik (Wiley és mtsai, 2004), a MIF-nél ellentétes hatásokat figyeltek meg. Proinflammatorikus hatás mellett a MIF az antiinflammatorikus glükokortikoidok természetes ellenregulátora.

A MIF a citokinek között egyedülálló módon két evolúciósan konzervált katalitikus motívumot tartalmaz, melyhez hasonlót eddig csak a bakteriális enzimekben azonosítottak. Ezek *-in vitro* izomerizációs/tautomerizációs és oxido-redukciós reakciókat katalizálnak. Bizonyított, hogy a MIF homotrimer harmadlagos szerkezete szükséges a tautomeráz katalitikus régió felépüléséhez. Az aktív kötőhelyet a MIF és *p*-hidroxi-fenilpiruvát (OH-PP) szubsztrátjának komplexét röntgenkristallográfiás analízissel (Rosengren és mtsai, 1997) a két szomszédos alegység által képzett hidrofób üregben azonosították (Lubetsky és mtsai, 2002).

A MIF enzimaktivitása közül egyiknek sem ismert a fiziológiai (vagy patofiziológiai) 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 (Orita és mtsai, 2002). Tehát a MIF katalitikus „zsebet” célzó kismolekulák új és szelektív anti-citokin terápiát képviselhetnek.

## CÉLKITŰZÉS ÉS TEMATIKAI FELOLSZTÁS

Az értekezésben bemutatott munka fő célja a MIF fenilpiruvát enzimaktivitásának vizsgálata és annak befolyásolása különböző vegyületekkel. E vizsgálatokat ún. „kommerciális” enzimen, humán mintákon és tubulinon végeztük. A leghatásosabb vegyületet *in vivo* modellben is kipróbáltuk.

A MIF és az osteoporosis lehetséges kapcsolatára az utóbbi időben egyre több adat lát napvilágot. Diákkörösként végzett osteoporosisal kapcsolatos munkámat utolsóként tárgyalom.

### **Munkám öt fő téma köré csoportosítható:**

- I. A MIF fenilpiruvát enzimaktivitásának vizsgálata
- II. A MIF mennyiségének és aktivitásának vizsgálata humán mintákban
- III. A hatékony MIF gátló kávésav hatásainak vizsgálata *in vivo* egér arthritis modellben
- IV. Mikrotubulus funkció és MIF kapcsolatának vizsgálata
- V. Postmenopausalis osteoporosis prevenciója növényi ösztrogénekkel

## MÓDSZEREK

### 1.1. Fehérje módszerek, tisztítások

Fehérje meghatározás: Bradford (1976) fotometriás módszerrel.

SDS-poliakrilamid gélelektroforézis: Laemmli (1970) szerint.

Western Blot: primer antitest: rabbit anti-rMIF (1:2.000), rabbit anti- $\alpha$ Tubulin (1:200), szekunder antitest: Goat anti-rabbit-IgG-HRP (horseradish peroxidase) konjugált (1:2.000).

Ezüstözés: a géleket 2 óráig és egy éjszakán át fixáltuk. Mosások után 2 óráig equilibráló oldatban inkubáltuk, végül ioncserélt vízzel, a felületre tapadt ezüstöt eltávolítottuk.

Tubulin izolálás: Shelanski (1973) módszerével.

A sertés agyat az agyhártyák eltávolítása után 1 ml/400 mg homogenizációs pufferben, jégfürdőn homogenizáltuk. A citoszól frakció ismételt ultracentrifugálását követően a kapott tubulint 37°C-os vízfürdőn polimerizáltuk GTP, MgCl<sub>2</sub> és glicerinnel hozzáadásával. A polimerizált tubulint centrifugálással elkülönítettük, a pelletet felfuszpendáltuk, és depolimerizáció céljából jégfürdőn tartottuk. Az így nyert tubulin mikrotubulushoz asszociált protein (MAP) tartalma nagy.

HM (high molar)- tubulin tisztítási módszer: Castoldi és Popov (2003) szerint.

A friss agyat (a lágy agyhártyát és az ereket eltávolítva) depolimerizáló pufferben 1 ml/g homogenizáltuk. Ultracentrifugálást követően a felülúszót a polimerizációhoz HM-PIPES pufferrel, GTP-vel, ATP-vel és glicerinnel egészítettük ki, majd 37°C-os vízfürdőn történt polimerizációt követően lecentrifugáltuk, a centrifugacső alján található zselét (tubulin) 20 ml depolimerizáló pufferrel felfuszpendáltuk. Ezt követően 0°C-on depolimerizáltuk, majd a polimerizációs-depolimerizációs lépéseket még kétszer elvégeztük. A depolimerizált tubulin utolsó centrifugálását követően a felülúszót hirtelen lefagyasztottuk.

### Ízületi homogenizátum készítése

Az egerek tibiotarsalis ízületeit kimetszettük, 1ml/10mg pufferben homogenizáltuk. A centrifugálás után kapott felülúszót használtuk az ELISA vizsgálatokhoz.

### 1.2. Kémiai vegyületek előállítása

Ezen módszerek megtervezését és a szintézisük kivitelezését dr. Lóránd Tamás (PTE AOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet) végezte. A vegyületek szerkezetének igazolása FT IR és NMR spektroszkópiai módszerekkel történt.

### **1.3. Immunológiai módszerek**

#### ELISA módszer (MIF ELISA)

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. A 96 lyukú lemezt capture antitesttel bevontuk és egy éjszakán keresztül inkubáltuk. Másnap, blokkolás után hozzáadtuk a standardot és a mintát 1x, 5x, 10x-es hígításban. Ezt követően előbb detektáló antitesttel, majd Streptavidin-HRP-vel, végül a szubsztráttal töltöttük fel. A reakciót  $H_2SO_4$  stop oldattal állítottuk le és 450 nm-en azonnal megmértük az egyes lyukak optikai denzitását (háttér: 570 nm).

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

#### TR-FIA, DELFIA módszer

Time Resolved Fluoroimmunoassay, Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay. Ezen módszerrel Prof. Dr. Hermann Adlercreutz laboratóriumában vizsgáltam a szérumok fitoösztrogén tartalmát (Folkhälsan Research Center; Inst. for Prev. Med., Nutrition and Cancer; Dept. of Clin. Chem. Univ. Helsinki; Finland).

A vizsgálandó plazmát  $\beta$ -glukuronidázzal és szulfatázzal összekeverve acetát pufferben 37°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. A hidrolízist követően a nemkonjugált enterolaktont dietil-éterrel extraháltuk. A hidrolizált extraktumot assay pufferben IgG-vel előkezelt mikrolemezre pipettáztuk, majd hozzáadtuk az antiszérumot (1:250.000 hígításában), és az eurórium jelölt enterolaktont (ENL) (1:400.000). Szobahőn történő 90 perces óvatos rázás után a lemezt kimostuk, majd a lyukakhoz hozzáadtuk a DELFIA felerősítő oldatot, és 5 perc múlva leolvastuk a fluoreszcencia mértékét. 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.

### **1.4. Bioaktivitás tesztek**

#### Fenilpiruvát tautomeráz aktivitás (ketonáz és enoláz reakció)

Méréseinket a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében, valamint a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben végeztük. MIF-ként marha veséből izolált tautomerázt használtunk (Sigma).

A fenilpiruvát tautomeráz aktivitás mindkét reakcióját 20°C-on, kétutas UV spektrofotométerrel mértük. A ketonáz reakciót 288nm-en, 75 másodpercig, az enolázt 300nm-en 900 s-ig követtük. A reakció elegy ketonáz esetén, a pufferen és az enzimen kívül, fenilpiruvát szubsztrátot tartalmazott. Az enoláz reakcióelegy a töményebb pufferen, enzimen és Na-fenilpiruvát szubsztráton kívül a stabilizálásért felelős bórsavat is tartalmazott. A vakban az enzim hiányzott. Az enzimreakció gátlóit frissen hígítottuk, és 1, 5, 20, 50, 100, 200 illetve 400  $\mu$ M végkoncentrációban adtuk a rendszerhez.

#### Tubulin polimerizáció

A tubulin polimerizációt 350 nm-en, az áteső UV fény diffrakciójával követtük kétutas UV spektrofotométerrel 33°C-on, a PTE ÁOK Biofizika Intézetében. A mérendő küvetába 1mg/ml

tubulint, a vakba reakciópuffert tettünk. Mindkét küvetta tartalmazott még  $MgCl_2$ -t és GTP-t. A méréseket a plató szakasz eléréséig folytattuk.

### **1.5. Immunhisztokémiai módszerek**

#### Fénymikroszkópos immunhisztokémia paraffinba ágyazott metszeteken

A 10 $\mu$ m vastag metszetek deparaffinálása és dehidrálása után, a metszeteket TRIS pufferben mostuk. Mikrohullámú kezelést követően az endogén peroxidáz aktivitás gátlására  $H_2O_2$ -ban inkubáltuk. Majd a metszeteket előbb 1%-os normál ló szérummal, aztán primer antitesttel (nyúlban termeltetett anti-MIF antitesttel: 1:5.000, ill. 1:10.000; és anti- $\alpha$ Tubulin: 1:200 antitesttel) inkubáltuk. A szekunder antitest (biotinilált anti-nyúl IgG: 1:100) után az avidin-biotin-peroxidáz (ABC) komplexszel inkubáltunk, végül az immunreakciót 3,3'-diaminobenzidinnel hidrogénperoxid jelenlétében tettük láthatóvá. A reakciót fénymikroszkóp alatt kontrolláltuk. Ismételt mosást követően, a metszeteket felszálló alkoholsorban dehidráltuk, xilolban derítettük és DEPEX-szel lefedtük. A primer antitesttel párhuzamosan negatív kontrollt is készítettünk.

#### Fénymikroszkópos immunhisztokémia úsztatott metszeteken

A 60  $\mu$ m vastag, vibratómmal készített metszeteket előbb 1%-os  $H_2O_2$ -ban, majd mosás után 1 % normál lószérumot és 0,4% Triton X-100-at tartalmazó oldatban inkubáltuk. A továbbiakban utalok a paraffinos metszetek immunhisztokémiájánál leírtakra. A megfestett metszeteket zselatinózott tárgylemezre húztuk fel, majd dehidráltuk, xilolban derítettük, és DEPEX-szel fedtük.

#### Elektronmikroszkópos immunhisztokémia

A hippocampust és a hozzá csatlakozó parahippocampalis kérget és a temporális neocortexet tartalmazó blokkot glutáraldehidet is tartalmazó formaldehidben fixáltuk. A 60  $\mu$ m vastag vibratómmal készített metszeteket cryoprotectio céljából szacharóz oldatban tartottuk. Az antitestek penetrációjának elősegítése érdekében, a metszeteket háromszor folyékony nitrogénben átfagyasztottuk, majd felolvasztottuk. Mosást követően hidrogén-peroxid oldatban inkubáltuk. A primer-, szekunder antitestekkel és az ABC komplexszel a korábban leírtaknak megfelelően végeztük az inkubálást, valamint az immunreakció láthatóvá tételét. Az elektronmikroszkópra szánt metszeteket 2% ozmium tetroxiddal utánfixáltuk, dehidráltuk, majd előbb 1:1 arányú műgyanta (Durcupan) és propilén oxid keverékben végül tiszta műgyantába helyeztük. Másnap 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, melyeket kivágtunk, majd átágyasztunk. A blokkból készített ultravékony metszeteket uranil-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztoltuk. A metszeteket Jeol típusú elektronmikroszkóppal értékeltük.

## **1.6. Állatkísérletes módszerek**

### 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.

### Komplett Freund adjuváns (CFA) indukált arthritis modell

A bal hátsó láb talpi felszínébe és a farktőbe paraffin olajban szuszpendált előlt Mycobaktériumokat tartalmazó CFA-t juttatunk be. A szisztémás hatás felerősítése céljából másnap azonos mennyiségű CFA-t injektáltunk a farktőbe (Helyes és mtsai, 2001). Plethysmometriával és aesthesiometriás módszerrel kontroll és kondicionáló méréseket végeztünk a CFA beadása előtt, majd az arthritis indukciót követő minden második napon.

### Lábduzzadás mérése

A lábak térfogatát plethysmometriával mértük, amelynek működése a közlekedőedények elvén alapul. A digitális kijelzőn cm<sup>3</sup>-ben leolvashatjuk a lábtérfogatot. A duzzadást a kontroll értékhez viszonyított %-ban adtuk meg.

### Mechanonociceptív küszöb mérése

A talp mechanikus ingerekre való érzékenységét aesthesiometriás módszerrel határoztuk meg. Az egereknek a mérés előtt időt hagyunk az akklimatizációra a kutató-kereső magatartás befejezéséig. Ezt követően a rács alá helyeztük az állítható helyzetű tompa végű tűt tartalmazó stimuláló egységet. A start gomb megnyomását követően a tompa végű fémtű addig fejtett ki fokozódó nyomást a talpra, amíg az állat el nem rántotta a lábát. Ezt a pillanatot, (nociceptív küszöböt), a digitális kijelzőn gramm-ban olvashattuk le. A mechanikai allodyníát, azaz a nociceptív küszöb csökkenését, a kiindulási kontroll értékekhez viszonyított %-ban adtuk meg.

## **I. A MIF FENILPIRUVÁT ENZIMAKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA**

### **Előzmények**

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. Más módszerek

mellett számítógépes modelleket is bevetettek, hogy ígéretes molekulákat találjanak. 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).

A Sigma cég által forgalmazott tautomeráz a rekombináns humán MIF-fel (rMIF) megegyező 12,4 kDa-os immunoreaktív „band”-et ad „western immunoblot”-on, és mindkét enzim ugyanolyan fenilpiruvát tautomeráz aktivitással rendelkezik (Rosengren és mtsai, 1997), valamint a flavonoid luteolin és quercetin hasonló módon befolyásolja mindkettő enzimaktivitását (Garai és Adlercreutz, 2004). Ezek alapján feltételezhető volt, hogy a Sigma tautomeráz enzimaktivitását befolyásoló többi kismolekula is hasonlóan hat a humán rMIF-re. A gátló molekulák vizsgálata során ezért a költséges rMIF helyett Sigma tautomerázt használtunk.

### **I.1. Egyes gyulladásgátló molekulák befolyásolják a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitását**

Az acetaminophent, melyről leírták, hogy gátolja a MIF dopachrom tautomeráz aktivitását (Senter és mtsai, 2002) fenilpiruvát tautomeráz reakcióra még nem vizsgálták, ezért elsőként ezt a molekulát teszteltük. Ezt követően a MIF szubsztrátjaihoz hasonló szerkezetű, gyulladáscsökkentő növényi hatóanyagokat, majd néhány ismert nem-szteroid gyulladásgátló szer (NSAID) hatását is vizsgáltuk. Kiszámítottuk a vizsgált anyagok félgátlási koncentrációit ( $IC_{50}$ ), a gátlás típusára egyes esetekben Lineweaver-Burk analízissel következtettünk.

#### **Eredmények**

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. 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. A kumarin származékok közül az umbelliferon (7-hidroxi-kumarin ( $IC_{50}=2,6\mu M$ )), a vegyes szerkezetű csoportba sorolt vegyületek közül a resveratrol ( $IC_{50}=1,9\mu M$ ) bizonyult a leghatékonyabbnak. Enoláz reakcióban leghatékonyabbnak szintén a kávésav bizonyult.



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 és az ibuprofen csak millimólos koncentrációban mutatott gátlást.
4. Lineweaver-Burk plot analízis alapján (kávésav esetében) a gátlás kompetíciós jellegű.

### **Következtetések**

Bár jelenleg nem ismert a MIF, mint gyulladáscsökkentő citokin enzimaktivitásának biológiai jelentősége, figyelemre méltó, hogy a vizsgált gyulladásgátló növényi hatóanyagok nagy része kifejezetten jó gátlónak bizonyult.

A vizsgált NSAID-kről ismert, hogy keto és enol formában is jelen vannak, de egyikük sem volt hatékony gátlója a MIF enzimaktivitásnak, mely azzal magyarázható, hogy a növényi hatóanyagok erős antioxidáns karaktere hozzájárulhat az *in vitro* rendszerünkben megfigyelhető hatáshoz. A gátlás pontos mechanizmusát minden egyes vegyületnél külön tisztázni szükséges majd a továbbiakban.

A MIF ellensúlyozza a glükokortikoidok gyulladásgátló és immunszuppresszív hatását. Feltételezhető, hogy a MIF fehérje farmakológiai gátlása emelheti az endogén glükokortikoid gyulladásgátló hatékonyságát, valamint potenciálisan csökkenteni képes a terápiás glükokortikoid-szükségletet krónikus autoimmun vagy gyulladáscsökkentő betegségek kezelésében.

### **I.2. Kémiai úton szintetizált kismolekulák hatása a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitására**

A legpotensebb növényi hatóanyagokhoz, illetve a MIF szubsztrátjaihoz részben hasonló szerkezeti tulajdonságokkal bíró, szintetikus vegyületeket kerestünk a gátló hatás fokozása céljából. Dr. Lóránd Tamás (PTE ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet) számos vegyületcsoportot szintetizált, melyeket elsősorban a MIF tautomeráz enol-keto irányú reakciójára teszteltünk.

### **Eredmények**

1. A kapott eredményeket, tehát a szerkezet hatás összefüggéseket vegyületcsoportként végezhetjük, mert abban valószínűleg szerepet játszanak a vizsgált molekulák szterikus- és elektronikus tulajdonságai is.

2. A 2-arilidencikloalkanonok csoportjából a leghatásosabb vegyületek: a 4-brómfenil- és a piperonilidén-származék. A hattagú gyűrűs vegyületeknél észlelt hatás rendszerint kisebb mértékű vagy hasonló a ciklopentanon-származékoknál észleletekhez.
3. A 2-arilidénbenzocikloalkanonok az előző családokhoz képest kisebb mértékű gátló hatással rendelkeznek, kivéve a bázisos 2-piridilszármazékokot.

### **Következtetések**

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) módszerrel nyert ismereteket is, hogy hatékony „lead molekulát” nyerjünk.

### **I.3. Ketontestek hatása a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitására**

Miközben a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitásának gátlóit kerestük, felfigyeltünk arra, hogy savas CH-csoport jelenléte fontos lehet a megfelelő gátlás eléréséhez. Ezek közül az acetilaceton különösen érdekes volt, mert tautomerizációra is képes (Watarai és Suzuki, 1974). Az acetilacetonnal rokon szerkezetű ketontestek szintén CH-savas természetűek, és *in vitro* befolyásolják a marha fehérvérsejtek migrációját (Suriyasathaporn és mtsai, 1999), mely csökkentheti az immunkompetenciát, de gyulladásgátló hatással is rendelkeznek (Sato és mtsai, 1992; Sjögren és mtsai, 1999).

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

### **Eredmények:**

1. A ketontestek képesek gátolni a MIF ketonáz aktivitását. A legjobb gátló az acetilaceton és a 2-propionil ciklohexanon volt. A benzilidén-aceton, az acetoacetát, és a  $\beta$ -hidroxivajsav mérsékelt gátlónak bizonyult, míg az aceton és az etil-acetoacetát csak nagyságrendekkel magasabb koncentrációkban mutatott gátlást.
2. A MIF fenilpiruvát enoláz aktivitására a ketontestek 10 mM-ig nem hatottak.

### **Következtetések:**

Az acetoacetát és a  $\beta$ -hidroxivajsav vérszintje fiziológias állapotokban 70-150  $\mu$ M között van (Kalapos és mtsai, 2003). *In vitro* gátló hatásukat tekintve ( $IC_{50}$ = 14 és 70 $\mu$ M) feltehetően *in*

*in vivo* is képesek a MIF enzimaktivitását befolyásolni. Amennyiben ez így lenne, és ha a MIF 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 produkcióját (Neufeld és mtsai, 1976).

#### **I.4. Egyes lipopoliszacharidok befolyásolják a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitását**

A vérbe került LPS az LPS-kötő fehérjéken (LBP) keresztül monocytákban, makrofágokban és neutrofileken a CD14 molekulához kötődik (Haziót és mtsai, 1997), ez szignált ad a Toll-like receptor-4 (TLR4) felé, amelynek expresszióját a MIF fokozza (Roger és mtsai, 2001). A MIF és LPS kapcsolatát figyelembe véve felmerült, hogy az LPS esetleg közvetlenül is befolyásolhatja a MIF tautomeráz aktivitását.

Különböző baktériumok teljes LPS-einek, valamint azok alegységeinek hatását teszteltük a MIF enzimaktivására. A kísérletben használt LPS-t a PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetből, dr. Kocsis Bélától kaptuk. Az LPS koncentrációkat a szérumban toxikus (40pg/l), „köztes” (20pg/l) és subklinikai (4pg/l) koncentrációinak megfelelően használtuk.

#### **Eredmények:**

1. Az LPS-ek koncentráció függő módon vagy gátolták vagy serkentették a reakciónkat.
2. Az *E. coli* és a *Salmonella sonnei* II teljes LPS-e 39°C-on koncentráció-függő módon serkenti a MIF tautomeráz aktivitásait.
3. A *Salmonella adalaid* teljes lipopoliszacharidja mindkét reakciót koncentrációfüggő módon gátolta, azonban a toxikus hatásért felelős Lipid-A komponens koncentrációfüggő módon serkentette az enzimreakciót.

#### **Következtetések:**

Az eltérő szerkezetű LPS-ek eltérő irányba befolyásolták a MIF tautomeráz aktivitását. A reakció gátló vagy serkentő irányát nagyban meghatározta az LPS szerkezete.

## **I.5. Flavonoidok és fitoösztrogének befolyásolják a MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitását**

1978-ban patkány uterusban felfedezett ún. II-es típusú nukleáris kötőhely nem csak az ösztrogént (Eriksson és mtsai, 1978), hanem a flavonoidok egy részét is képes kötni (Markaverich és mtsai, 1988). További jellemzője a II-es típusú kötőhelynek, hogy tirozináz szerű enzimaktivitással asszociáltnan detektálták (Garai és Clark, 1992), melynek szubsztrát-specifitása hasonló volt a MIF tautomerázéhoz. II-es típusú kötőhelyet tartalmazó patkány uterus sejtmag kivonatában a MIF-hez hasonló tautomeráz aktivitást is kimutattak (Garai és mtsai, 2001), melynek flavonoid ligandjai gátolták a MIF tautomeráz aktivitását is (Garai és Adlercreutz, 2004). Ezen adatok arra utalnak, hogy a MIF-nek szerepe lehet az ún. II-es típusú ösztrogén kötődésben.

A MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitására vizsgáltuk olyan vegyületek hatását, melyek jó ligandjai a II-es típusú ösztrogén kötőhelynek. Vizsgáltunk továbbá néhány olyan fitoösztrogént is, melyekről ismert, hogy képesek a csontsűrűséget jótékonyan befolyásolni (Fanti és mtsai, 1998). 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:**

1. A II-es típusú kötőhely ligandjai közül mind a szintetikus ösztrogén (diethylstilboestrol (DES)), mind az ösztrogén metabolit (2-metoxi ösztradiol) részleges gátló hatást mutatott.
2. A csontanyagcserét befolyásoló fitoösztrogének közül a MIF vizsgált enzimaktivitását legeredményesebben a daidzein gátolta ( $IC_{50}=16,33 \mu M$ ). Ezt követte annak metabolitja, az equol, majd a genistein.
3. A vizsgált flavonoidok ketonáz és enoláz reakciókban, eltérő koncentrációkban mutattak gátló gátlást. Például az eperfában található morin az enoláz reakcióban közel kétszer jobb gátlást eredményezett a ketonázhoz képest. Ezzel szemben a naringenin, melynek fő forrásai a citrusfélék éppen enoláz reakcióban bizonyult gyengébbnek.

### **Következtetések:**

Az általunk vizsgált flavonoidok és 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, és a csontanyagcserét is kedvezően befolyásoló equol az enoláz irányú reakcióban a többi vegyülettől eltérően eredményesebbnek bizonyult.

## **II. MIF MENNYISÉGÉNEK ÉS AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA HUMÁN MINTÁKBAN**

A rheumatoid arthritises (RA) betegek ízületi folyadékában és az endometriosisos betegek peritonealis folyadékában is megemelkedett a MIF koncentrációja, de ennek enzimatisus aktivitását még nem vizsgálták.

### **II.1. MIF mennyisége és aktivitása ízületi gyulladásban szenvedők ízületi folyadékában és szérumban**

A rheumatoid arthritisben szenvedő betegek synoviális folyadékában 5-10-szer magasabb MIF koncentrációt találtak, mint egészséges egyéneknél (Leech és mtsai, 1999; Onodera és mtsai, 1999). Továbbá kapcsolatot mutattak ki az ízület MIF tartalma és a RA aktivitása között is (Morand és mtsai, 2002).

A programban a PTE ÁOK Immunológiai és Reumatológiai Klinikáján, ízületi gyulladásos panaszokkal jelentkező betegek vettek részt, akik kivizsgálása, valamint a kontrollvizsgálataik során ízületi punkció vált szükségessé, mellyel párhuzamosan vérvétel is történt.

A mintákat a klinikusokkal egyetértésben a következő diagnózisok alapján csoportosítottuk: Rheumatoid arthritis (RA): n=13; Szeronegatív Spondylarthritis (SNSA): n=10; Arthrosis n=8; Arthritis urica (köszvény) n=4.

Az ízületi folyadékok és szérumok MIF immunoreaktivitását a minta tautomeráz enzimaktivitásával korrelációban vizsgáltuk.

#### **Eredmények:**

1. Mind a szérumban, mind az ízületi folyadékban ELISA vizsgálattal megemelkedett MIF szinteket mértünk. Az egyes betegségeket összehasonlítva SNSA-ban az ízületi folyadékok MIF tartalma volt a legmagasabb. Az SNSA-s szérumok MIF tartalma között már szignifikáns különbség van mind a rheumatoid arthritises (\*:p<0.05), mind az

arthrosisos (\*\*:p<0.01) csoporthoz viszonyítva. Hasonló különbség mutatható ki a szérumok egységnyi fehérjére vonatkoztatott MIF tartalma között is.

2. A megemelkedett MIF szintek ellenére a vizsgálati mintákban konzisztensen csak fenilpiruvát enoláz aktivitást tudtunk kimutatni. Ketonáz irányban csak a minta hígítását követően tudtunk némi abszorbancia csökkenést detektálni.
3. Az ízületi folyadék enoláz aktivitását a vizsgált MIF inhibitorok hatékonyan gátolták.
4. Western blot vizsgálattal is igazoltuk a MIF jelenlétét. Kiemelendő azonban, hogy a MIF immunoreaktivitás nem csak a dimer (25 kDa) és trimer (37 kDa) molekulásúlynak megfelelően migrál, hanem immunoreaktív „band” detektálható a 130, és a 45 kDa molekulásúly tartományban is.

## **II.2. MIF mennyisége és aktivitása humán endometriosisos betegek peritonealis folyadékában**

Az endometriosisos nők peritonealis mosófolyadékában fokozott MIF immunoreaktivitást találtak, mely különösen az aktív betegség első két stádiumára volt jellemző (Kats és mtsai, 2002). Az endometriális MIF szintjét immunhisztokémiával vizsgálva a MIF mennyiségének ciklusfüggését tapasztalták (Akoum és mtsai, 2002).

Tanulmányunkban a Baranya Megyei Kórház, Szülészeti és Nőgyógyászati Osztályán - infertilitás miatt - diagnosztikus laparoscopián átesett nőbetegekből nyert 1-2 ml peritonealis mosófolyadékból vizsgáltuk a MIF tartalmat és annak tautomeráz aktivitását (Garai és mtsai, 2003). (Kontroll: n=19; I. std: n=22; II. std: n=8; III. std: n=6; IV. std: n=3)

### **Eredmények:**

1. Az endometriosisos betegektől levett hasúri folyadékból megemelkedett MIF tartalom volt kimutatható az endometriózisban nem szenvedőkhöz képest.
2. A fenilpiruvát enol-keto átalakulása és a MIF immunoreaktivitás között nem lehetett korrelációt kimutatni. Ugyanakkor a fenilpiruvát keto-enol átalakulását jelző ún. enoláz reakció és a MIF immunoreaktivitása között egyértelmű korreláció volt tapasztalható.
3. Mind a peritonealis folyadék enoláz aktivitásának mértéke, mind immunoreaktivitása magasabb volt az endometriosis I-es és II-es stádiumaiban összehasonlítva az endometriosisal nem rendelkezők mintáival.
4. A peritonealis 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 halványabb jel 37 kDa-nál is gyakran észrevehető volt.

### **Következtetések**

Mind az ízületi folyadékban, mind a peritonealis mosófolyadékban csak a fenilpiruvát enoláz aktivitás volt értékelhető, melynek mértéke korrelált a MIF ELISA-val mért immunoreaktivitásával. Ezért feltételezhetjük, hogy a humán mintákban van valami olyan anyag (feltehetőleg fehérje természetű), mely megakadályozza az ellenkező irányú 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 gyulladássos hólyag intralumináris folyadékából, a-MIF antitesttel végzett Western blot vizsgálat során 170, 130 és 12 kDa-nál detektáltak MIF immunoreaktivitást. Ezen mintákban az asszociált fehérjét  $\alpha$ 2-makroglobulin proteináz inhibitoroként azonosították.

### **II.3. MIF szérumszintjének változása laparotomián átesett betegekben**

Állatkísérletekben bakteriális stimulus hatására 6 órán belül számos sejtben (így a májsejtben is) MIF-termelés indult meg (Meinhardt és mtsai, 1997). Gando és munkatársai (2001) daganat miatt májrezekción átesett betegeknél a kortizol szinttel párhuzamos MIF-szekréció emelkedést találtak, melyet arra vezettek vissza, hogy a sebészi stimulus aktiválja a hypothalamus-hipofízis-mellékvese tengelyt (HPA tengely), és párhuzamosan emelkedik a plazma adrenokortikotrop hormon (ACTH), glükokortikoid, valamint a MIF szintje is.

A PTE ÁOK Anaesthesiológiai és Intenzív Therápiás Intézet valamint a Laboratóriumi Medicina Intézet közreműködésével végzett prospektív, leíró klinikai tanulmányunkban azt vizsgáltuk, hogy a daganatos betegeknél a bélmegnyitás, mint várhatóan jelentős endotoxin felszabadulással járó beavatkozás, mennyire befolyásolja a MIF szérumszintjét a hasonló műtéti inzultussal járó, bélrezekció nélküli beavatkozáshoz képest, illetve az befolyásolja-e a korai posztoperatív morbiditást és mortalitást?

Vizsgálatunkba 28 beteget vontunk be. Az első csoportba (A) azon betegek kerültek, akiknél májdaganat miatt részleges májrezekció történt (10 beteg), míg a másik csoportba (B) olyan betegeket vizsgáltunk, akiknél az operáció során bélmegnyitás történt (18 beteg).

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 ezek közül a szérumban MIF ELISA vizsgálatot végezte.

### **Eredmények**

1. Mindkét betegcsoport műtét előtti MIF értékét ( $MIF_0$ ) a normál tartományon belül találtuk és nem tapasztaltunk statisztikailag szignifikáns különbséget a két betegpopuláció között.
2. Közvetlenül az operáció után mért érték ( $MIF_1$ ) ezzel szemben a májrezekción átesett betegeknél szignifikánsan magasabb volt, mint a másik csoport betegeinél.
3. A műtétet követő nap mindkét csoportnál ismét normál MIF értéket mértünk, mely nem emelkedett a második és számottevően nem változott a harmadik napon sem.

### **Következtetések:**

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, 2005), mely feltételezés igazolására további tanulmányok szükségesek.

## **III. A HATÉKONY MIF GÁTLÓ KÁVÉSÁV HATÁSAINAK VIZSGÁLATA *IN VIVO* EGÉR ARTHRITIS MODELLBEN**

### **Előzmények:**

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

CFA állatmodellben teszteltük a népi gyógyászatban hagyományosan ízületi gyulladások kezelésére alkalmazott teák fő hatóanyagát, a kávésavat, mely *in vitro* erős MIF tautomeráz gátlónak is bizonyult. A kísérletek Balb/c egereken, a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetével kollaborációban történtek.

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



feláldozását követően a tibiotarsalis ízületeket kimetszettük és meghatároztuk belőlük az IL-1 $\beta$  koncentrációját.

### **Eredmények**

1. A CFA-val kiváltott lábduzzadást a kávésav dózis-függő módon szignifikánsan (\*:p<0,05, \*\*: p<0,01) 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.
2. A CFA hatására kialakuló gyulladással mechanikai allodiniát a kávésav a CFA-val kezelt lábakon mind 10 mg/kg, mind 100 mg/kg i.p. dózisban szignifikánsan (\*\*\*:p<0,001) csökkentette, Koncentráció-hatás összefüggés néhány napnál ez esetben is megfigyelhető volt.
3. Ízületi homogenizátumból ELISA vizsgálattal történő IL-1 $\beta$  koncentrációmérés azt mutatja, hogy mind a CFA-val kezelt (bal) lábon, mind az ellenoldali tibiotarsalis ízületben a kávésav csökkentette a gyulladással citokin termelését. A gátló hatás a bal lábon mindkét, a jobb lábon a 100mg/kg dózissal kezelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva szignifikánsnak bizonyult.

### **Következtetések:**

A MIF tautomeráz aktivitását *in vitro* gátló kávésav *in vivo* CFA-val kiváltott egér arthritis modellben eredményesen csökkentette a lábduzzadást, a gyulladással mechanikai allodiniát és gyulladással citokin termelést. E tájékozódó jellegű kísérletsorozat azonban csak indirekt bizonyítékokkal szolgálhat az ezen ízületi gyulladás modellben kulcsszereplő MIF és annak enzimaktivitását gátló kismolekula gyulladásgátló hatásának lehetséges kapcsolatára. További szövettani vizsgálatok és citokin mérések folyamatban vannak a gyulladásgátló hatás mechanizmusának feltárására.

#### IV. MIKROTUBULUS FUNKCIÓ ÉS MIF KAPCSOLATÁNAK VIZSGÁLATA

##### **Előzmények:**

A MIF és a mikrotubulus funkció kapcsolatára számos indirekt bizonyíték utal. A tengerimalac makrofágok migrációját alacsony koncentrációjú colchicin vagy vinblastin kezelés jelentősen fokozta, és megakadályozza a MIF migráció gátló hatását (Pick és Abrahamer, 1973; McCarthy és mtsai, 1979). 16 órás MIF expozíció hatására a polimerizált tubulin a 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.

Alzheimer kórban a senilis plakkok amyloid  $\beta$ - proteinjéhez ( $A\beta$ ) számos fehérje képes aggregálódni, többek közt a MIF és a béta tubulin is, melynek a plakk képzésben és/vagy lerakódásban kórélettani jelentőséget tulajdonítanak (Oyama és mtsai, 2000). Kimutatták, hogy az agyban expresszált MIF savas környezetben képes amyloid fibrillumokat képezni (Lashuel és mtsai, 2005). Az egyik leghatásosabbnak talált MIF tautomeráz gátló, a kurkumin Alzheimer kórban képes csökkenteni az amyloid és plakk képződést (Lim és mtsai, 2001).

Patkány agy számos neuronjában figyeltek meg MIF expressziót (Bacher és mtsai, 1998). A ciszternába adott LPS injekció hatására a neuronális MIF mRNS és fehérje expresszió megemelkedik (Bacher és mtsai, 1998). Tehát az agyban 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, 1999).

Vizsgálataink során a következő kérdésekre kívántunk választ kapni:

1. Kimutatható-e MIF immunoreaktivitás a sertés agyból izolált tubulin preparátumban?
2. Befolyásolja-e a MIF immunoreaktivitást a több polimerizációs-depolimerizációs cikluson végrehajtott tubulin tisztítási folyamat?
3. Rendelkezik-e kimutatható enzimaktivitással az egy ciklusban izolált, nagy MAP tartalmú tubulin? /A mikrotubulus asszociált proteinek a citoskeletális polimerhez kötődő, stabilizáló vagy destabilizáló fehérjék./
4. Változik-e 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. Befolyásolják-e a tubulin polimerizációját a tautomeráz reakciót gátló kismolekulák?
8. Megtalálható-e MIF a sertés agykéregben, és ha igen, mely idegrendszeri sejtek tartalmazzák?
9. Kimutatható-e morfológiai módszerrel a MIF tubulin kapcsolat?

### **Eredmények:**

1. A tubulin preparátumunkban mind Western blottal, mind ELISA vizsgálattal kimutatható a MIF jelenléte.
2. A három ciklus tubulin és felülúszó Western blot analízise jól mutatja, hogy az anti-MIF-immunoreaktivitás mind a tubulinban, mind a felülúszóban csökken, olyannyira, hogy a 3. ciklusban jól kivehető sáv már nem látszik.
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 felülúszók enzimaktivitásait vizsgálva hasonló eredményt kaptunk.
5. Az egységnyi fehérjére eső MIF mennyisége előző vizsgálatainkkal összhangban legmagasabb az első, és legalacsonyabb a harmadik ciklusban.
6. A vizsgált kismolekulák 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. Az enoláz reakció vizsgálata során, a legjobb gátló molekula a kávésav volt. Az acetaminophen - a többi vizsgált molekulával ellentétben - a tubulin tautomeráz aktivitását csak jóval nagyobb koncentrációban gátolta.
7. A tubulin polimerizációt a vizsgált növényi hatóanyagok többnyire gátolták, de az acetaminophen serkentette.
8. Sertésagyon végzett immunhisztokémiai vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a MIF az agykéregben gátló és serkentő neuronokban is expresszálódik.
9. A MIF-immunreaktív sejtek elektronmikroszkópos vizsgálatával kimutattuk, hogy a sejtek valóban idegsejtek. A MIF immunpozitivitás az idegsejtek nagy mennyiségű párhuzamos mikrotubulust tartalmazó dendritjeiben és axonjaiban kifejezett volt.

## **Következtetések**

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) idegsejt csoportokban való megjelenésére jelenleg nincsen meggyőző magyarázatunk. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a MIF-hez hasonlóan más fehérjék (pl. calbindin) esetében is megfigyelhető hasonló jelenség (Baimbridge és mtsai, 1992).

## **V. POSTMENOPAUSALIS OSTEOPOROSIS PREVENCIÓJA NÖVÉNYI ÖSZTROGÉNEKKEL**

### **Előzmények:**

A MIF szerepét az osteoporosisban vad típusú, ovariectomizált (OVX), valamint MIF hiányos egereken vizsgálták. Eredményeik szerint a MIF szükséges az ösztrogénhiány miatt kialakult csontvesztéshez. Mivel a MIF a citokinek termelését fokozza (Baugh és Donnelly, 2003) felvethető, hogy a csont resorptiót okozó mediátorok aktiválása, részben a szérum MIF szint gyors megemelkedésének tulajdonítható (Oshima és mtsai, 2006).

A postmenopausalis osteoporosist jelenleg hormonpótló kezeléssel próbálják megelőzni, de a hormonpótló kezelések mellékhatásai miatt a menopauzás populáció körében egyre nagyobb teret hódítanak a különféle növényekből származó, ösztrogén hatással rendelkező vegyületek is.

Intervenciós tanulmányunkban menopauzás populációban a fitoösztrogének és a célzott mozgásprogram osteoporosis prevencióra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A diétás intervenciót egy szabadalommal védett speciális magos sütemény jelentette, mely 32% teljes szóját és 23% lenmagot tartalmazott. Ebből az önként jelentkező, változókorban levő nőknek egy éven keresztül naponta 10-12 dkg-t kellett elfogyasztaniuk.

Attól függően, hogy mit vállaltak, különböző csoportokba kerültek: kontrol csoport (intervenció nélkül): (n=21), fitoösztrogén sütemény (n=15), torna (heti 3x1 óra, ebből 1 óra szakgyógytornász felügyeletével) (n=6), keksz és torna együtt (n=14). A tanulmány során

negyedévenként ötféle fitoösztrogén vérszintjét monitoroztuk TR-FIA DELFIA módszerrel: (genisteint, daidzeint, equol, o-desmethyl-angolensint (ODMA), enterolaktont). A csontsűrűséget DEXA (Dual-Energy X-Ray Absorptiometry) vizsgálattal a PTE ÁOK Központi Klinikai Radioizotóp Laboratóriumában mérték. Mivel az izoflavonoidok egy része állatkísérletekben hypothyreosist okoz (Divi, 1997), monitoroztuk a thyroidea stimuláló hormont (TSH) is.

## **Eredmények**

1. A résztvevők kiindulási, nagyon alacsony fitoösztrogén vérszintjét már negyedéves süteményfogyasztás is jelentősen megemelte.
2. Az ösztrogenitás szempontjából legpotensebb equol szintje is növekedett. Figyelemreméltó, hogy nagymértékű egyéni eltéréseket találtunk a plazmaszintekben, különösen az equol és az ODMA metabolitok esetén, melyek háttérében az egyéni gastrointestinalis metabolizmus állhat. Ennek megfelelően a populáció ~80-90%-a ODMA producer, (Kelly és mtsai, 1995; Arai és mtsai, 2000), ~33-50%-a ún. equol producer (Rowland és mtsai, 2000; Lampe 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 menopauzás 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.
5. Az ODMA producerek esetében a változás az egyes csoportok között is szembetűnő. Közel azonos kiindulási BMD szint ellenére, a lumbális szakaszon a keksz fogyasztása tornával kombinálva az ODMA producer populációban szignifikáns mértékben ( $p < 0.05$ ) megakadályozta a csontsűrűség csökkenését. A csípő területén a fitoösztrogén tartalmú keksz fogyasztása már önmagában is képes volt szignifikáns változásokat eredményezni.
6. A TSH a tanulmány végéig a normális tartományon belül volt.

## **Következtetések**

A kiindulási alacsony fitoösztrogén szintek mutatják, hogy a hazai étrend igen szegényes fitoösztrogén bevitelt jelent. A fitoösztrogének számos jótékony hatása miatt, a bevitel mérsékelt emelése is hosszútávon jelentős javulást eredményezhetne az érintett populáció népegészségügyi mutatóiban. Ez volt az első alkalom, hogy hazai populáción az öt leghatásosabb fitoösztrogén vérszintjét párhuzamosan tanulmányozhattuk.

Csontsűrűség vizsgálat szempontjából az egy év rövid távú követésnek minősül, de biztató jelnek számít, hogy az equol és ODMA producer populációk csontsűrűsége az intervenció alatt nem csökkent. A megfelelő étrendnek és a rendszeres testmozgásnak a csonttömeg megőrzésében, esetleg javításában a menopausa után is jelentős szerepe lehet.

## A LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

### I. A MIF fenilpiruvát enzimaktivitásának vizsgálata

- I.1. Az acetaminophen nem csak a MIF dopachrom tautomeráz aktivitását gátolja (Senter és mtsai, 2002), hanem a fenilpiruvát tautomériát is (Molnár és Garai, 2005), mely utóbbit a gyulladásgátló kismolekulák is koncentrációfüggő módon gátolták.
- I.2. A növényi hatóanyagokhoz hasonló szerkezetű, kémiai úton szintetizált vegyületsoportokkal ugyan elértük közel ugyanazt a hatást, de azoknál eredményesebb gátlást eddig még nem tudtunk produkálni.
- I.3. A gyűrűs struktúrával nem rendelkező ketonok úgy tűnik erősebben gátolják a MIF ketonáz aktivitását *in vitro* (Garai és mtsai, 2005).
- I.4. Az eltérő szerkezetű LPS-ek koncentrációfüggő módon befolyásolták a MIF tautomeráz aktivitását. A reakció gátló vagy serkentő irányát nagyban meghatározta az LPS szerkezete.
- I.5. A csontsűrűséget jótékonyan befolyásolni képes fitoösztrogének közül a MIF fenilpiruvát tautomeráz gátlásában legeredményesebbnek a daidzein mutatkozott.

### II. 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.

- II.1. A peritonealis folyadék enoláz aktivitása, és immunoreaktivitása is magasabb volt az endometriosis I-es és II-es stádiumaiban összehasonlítva az endometriosisal nem rendelkezők mintájával (Garai és mtsai, 2006).
- II.2. Az ízületi folyadékokban és a hozzájuk tartozó szérumokban különösen magas MIF szintet a Szeronegatív Spondylarthritisben mértünk.
- II.3. A bélmegnyitással járó, és nem járó (májrezekció) hasi műtéteken átesett betegek közül a szérum MIF tartalma, az utóbbi csoportban, közvetlenül a műtét után szignifikánsan magasabb volt, mely a műtétet követő nap ismét a normál tartományba került (Márton és mtsai, 2005).

- III. A kávésav *in vivo* CFA arthritis modellben is koncentrációfüggő módon, szignifikánsan csökkentette mind az oedema, mind a fájdalom mértékét a kontroll állatokéhoz képest, mely indirekt bizonyítéka lehet az ízületi gyulladásban is részt vevő MIF és annak enzimaktivitását gátló kismolekula kapcsolata között.
- IV. A kismolekulák és a flavonoidok koncentráció függő módon gátolták a tubulinban jelenlevő MIF ketonáz és enoláz reakcióját. A tubulin polimerizációját egyes molekulák gátolták, míg mások serkentették. A többszörös tubulin tisztítási folyamat eredményei alapján felvethető, hogy a MIF olyan MAP-ként viselkedik, mely a tisztítás során eltávolítható a tubulintól. Morfológiai vizsgálataink alapján a MIF mind a gátló, mind a serkentő neuronokban megtalálható. Polimerizált tubulinban a MIF apró vesiculumok formájában a tubulin átmetszetek körül helyezkedik el.
- V. A postmenopausalis osteoporosist vizsgáló intervenciós tanulmányunkban sikerült elérnünk a fitoösztrogén vérszintek jelentős emelkedését, továbbá az ODMA és equol producerek esetében, a combnyak és ágyéki gerinc szakaszon, a csontsűrűség tekintetében hosszabb távon pozitív hatást remélhetünk.

A MIF egy szinte „elfeledett” citokin volt, és csak az elmúlt 15 évben vált az immuno-neuro-endokrin 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.

## IRODALOMJEGYZÉK

- Akoum és mtsai, *Fertil. Steril.* 77, 989-994 (2002)
- Arai és mtsai, *J. Epidemiol.* 10, 127-135 (2000)
- Bacher és mtsai, *Mol. Med.* 4, 217-230 (1998)
- Baimbridge és mtsai, *Trends Neurosci.* 15, 303-308 (1992)
- Baugh és Donnelly, *J. Endocrinol.* 179, 15-23 (2003)
- Bernhagen és mtsai, *Nature* 365, 756-759 (1993)
- Bloom és Bennett, *Science* 153, 80-82 (1966)
- Bradford, *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)
- Calandra és Roger, *Nat. Rev. Immunol.* 3, 791-800 (2003)
- Castoldi és Popov, *Protein Expres. Purif.* 32, 83-88 (2003)
- David, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56, 72-77 (1966)
- Dios és mtsai, *J. Med. Chem.* 45, 2410-2416 (2002)
- Divi, *Biochem. Pharmacol.* 54, 1087-1096 (1997)
- Eriksson és mtsai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81 1-7 (1978)
- Fanti és mtsai, *Osteoporosis Int.* 8, 274-281 (1998)
- Gando és mtsai, *Surg. Today.* 31, 605-609 (2001)
- Garai és Clark, *Steroids* 57, 248-256 (1992)
- Garai és mtsai, 82nd Annu. Meet. Endoc. Soc. Denver, June 21-24 (2001)
- Garai és mtsai, *J. Reprod. Immunol.* 58, 186, No. 11.1 (O) (2003)
- Garai és Adlercreutz, *J. Steroid Biochem.* 88, 377-381 (2004)
- Garai és mtsai, *Life Sci.* 77, 1375-1380 (2005)
- Garai és mtsai, *Front. Biosci.* 11, 595-619. (2006)
- Haziot és mtsai, *Scand. J. Immunol.* 46, 242-245 (1997)
- Helyes és mtsai, *Br. J. Pharmacol.* 134, 1571-1579 (2001)
- Hudson és mtsai, *J. Exp. Med.* 190, 1375-1382 (1999)
- Kalapos és mtsai, *BBA* 1621, 122-139 (2003)
- Kats és mtsai, *Fertil. Steril.* 78, 69-76. (2002)
- Kelly és mtsai, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208, 40-43 (1995)
- Lacey és mtsai, *Arth. Rheum.* 48, 103-109 (2003)
- Laemmli, *Nature* 227, 680-685 (1970)
- Lampe és mtsai, *J. Nutr.* 131, 740-744 (2001)
- Lashuel és mtsai, *BBRC* 338, 973-280 (2005)
- Leech és mtsai, *Arth. Rheum.* 41, 910-917 (1998)
- Leech és mtsai, *Arth. Rheum.* 42, 1601-1608 (1999)
- Leech és mtsai, *Arth. Rheum.* 48, 1881-1889 (2003)
- Lim és mtsai, *J. Neurosci.*, 21, 8370-8377 (2001)
- Lubetsky és mtsai, *J. Biol. Chem.* 277, 24976-24982 (2002)
- Markaverich és mtsai, *J. Steroid Biochem.* 30, 71-78 (1988)



Márton és mtsai, *Aneszteziológia és Intenzív Terápia* 35, 26-33 (2005)  
Matsunaga és mtsai, *J. Biol. Chem.* 274, 3268–3271 (1999)  
McCarthy és mtsai, *Cell. Immunol.* 46, 409-415 (1979)  
Meinhardt és mtsai, *Am. J. Pathol.* 150, 235-246 (1997)  
Metz és Bucala, *Adv. Immunol.* 66, 197-223 (1997)  
Mitchell és mtsai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 345–350 (2002)  
Molnár és Garai, *Int. Immunopharmacol.* 5, 849-856 (2005)  
Morand és mtsai, *Rheumatology* 41, 558–562 (2002)  
Neufeld és mtsai, *Metabolism* 25, 877–884 (1976)  
Onodera és mtsai, *Cytokine* 11, 163–167 (1999)  
Onodera és mtsai, *Arth. Rheum.* 50, 1437–1447 (2004)  
Orita és mtsai, *J. Med. Chem.* 44, 540-547 (2001)  
Orita és mtsai, *Curr. Pharm. Des.* 8, 1297–1317 (2002)  
Oshima és mtsai, *FEBS Lett.* 580, 1251-1256 (2006)  
Oyama és mtsai, *Biochim. Biophys. Acta* 1479, 91–102 (2000)  
Petrovsky és mtsai, *Immunol. Cell. Biol.* 81, 137-143 (2003)  
Pick és Abrahamer, *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 44, 215-220 (1973)  
Pick és mtsai, *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 58, 149-159 (1979)  
Roger és mtsai, *Nature* 414: 920-924 (2001)  
Rosengren és mtsai, *FEBS Lett.* 417, 85–88 (1997)  
Rowland és mtsai, *Nutr. Cancer* 36, 27-32 (2000)  
Santos és mtsai, *J. Rheumatol.* 31, 1038–1043 (2004)  
Sato és mtsai, *Life Sci.* 51, 113–118 (1992)  
Senter és mtsai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 144–149 (2002)  
Setchell és mtsai, *J. Nutr.* 132, 3577-3584 (2002)  
Shelanski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 765-768 (1973)  
Sjögren és mtsai, *Contact Dermatitis* 41, 22–29 (1999)  
Sun és mtsai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5191–5196 (1996)  
Suriyasathaporn és mtsai, *Vet. Immunol. Immunop.* 68, 177–186 (1999)  
Suzuki és mtsai, *Immunol. Lett.* 51, 141-147 (1996)  
Taylor és mtsai, *Biochemistry* 38, 7444-7452 (1999)  
Vera és mtsai, *J. Urol.* 174, 338-343 (2005)  
Watarai és Suzuki, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 36, 1815–1820 (1974)  
Wiley és mtsai, *J. Immunol.* 172, 4995–5005 (2004)  
Zhang és Bucala, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 3193-3198 (1999)

## A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

### Közlemények

1. Garai J., Világi Sz., Répásy I., Verzár Zs., **Molnár V.**, Bódis J. Kivihető-e a teljes szója alapú táplálék beépítése a magyar menopauzás populáció étrendjébe, Magyar Nőorvosok Lapja 67, 205-210 (2004)
2. **Molnár V.**, Garai J. Plant-derived anti-inflammatory compounds affect MIF tautomerase activity. Int. Immunopharm. 5(5), 849-856 (2005). *IF(2004):1,827*
3. Garai J, Lóránd T., **Molnár V.** Ketone bodies affect the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor. Life Sci. 77(12), 1375-1380, (2005), *IF(2004): 2,158*
4. 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. Aneszt. Intenzív Terápia, 35(3) 26-33, (2005)
5. Garai J., **Molnár V.**, Varga T., Koppán M., Török A., Bódis J.. Endometriosis: harmful survival of an ectopic tissue. Front. Biosci. 11, 595-619, (2006) *IF(2004):3,226*
6. Garai J., **Molnár V.**, Lóránd T.. A novel class of small molecular inhibitors of MIF tautomerase with antiinflammatory potential:  $\alpha,\beta$ -unsaturated cyclic ketones (Közlésre előkészítve)

### 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 J. Reprod. Immunol. 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. Aneszt. Intenzív Terápia: 34:(Sz. 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 Physiol. Hung., 91, (3-4), 297; (2004)
4. **Molnár V.**, Garai J., Lóránd T. The enzymatic activity of MIF a possible target for anti-inflammatory molecules? Acta Physiol. Hung. 91 (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. Int. Care Med. 31 (s1, S114, (2005) *IF(2004): 3,034*
6. Garai J., **Molnár V.**, Zámbo 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

#### Előadások

1. **Molnár V.**, Garai J. Egy gyulladáscsökkentő citokin enzimaktivitása. PAB Sejtbiológiai Munkabizottságának Doktorandusz Szimpóziuma, 2003. január 8. Pécs
2. **Molnár V.**, Garai J. A rheumatoid arthritis és az osteoporosis kapcsolata. Magyar Menopausa Társaság 5. Országos Kongresszusa, 2003. június 12-14. Balatonfüred
3. **Molnár V.**, Garai J. A komplementer medicina helye és lehetőségei a menopausális ellátásban. A Magyar Nőorvos Társaság Dél-nyugat Magyarországi Szekciójának V. Kongresszusa, 2003. szeptember 26-27. Nagykanizsa- Zalakaros
4. Márton S., Ittész B., Szabó K., Bogár L., **Molnár V.**, Garai J., Kőszegi T. Makrofág migráció inhibitor faktor (MIF) kinetikájának összehasonlító vizsgálata daganat miatt végzett bélrezekciót valamint májrezekciót követően. Magyar Aneszteziológiai és Intenzívterápiás Társaság XXIV. Nemzetközi Kongresszusa, 2004. május 27-29. Eger
5. Garai J., **Molnár V.**, Gabrieli P., Vigh É. A MIF citokin enzimaktivitásának egyes funkciói hozzájárulhatnak a hatásmechanizmushoz. Magyar Élettani Társaság LXVIII. Vándorgyűlése, 2004. június 7-9. Debrecen
6. **Molnár V.**, Bódis J., Zábó K., Schmidt E., Hock M., Répásy I., Világi Sz., Garai J. Diétás intervenció szerepe az osteoporosis prevencióban. Magyar Táplálkozástudományi társaság XXXIX. Vándorgyűlése, 2004. október 28-30. Hajdúszoboszló
7. **Molnár V.**, Garai J., Lóránd T. Gyulladásgátló növényi hatóanyagok befolyásolják a MIF citokin enzimaktivitását. Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXXIX. Vándorgyűlése, 2004. október 28-30. Hajdúszoboszló
8. Garai J., **Molnár V.**, Zábó K., Schmidt E., Répásy I., Világi Sz., Bódis J. 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. Garai J., **Molnár V.**, Varga T., Török A., Bódis J. 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 V.**, Gabrieli P., Németh E., Schumacher E., Vigh É., Garai J. Növényi fenolok és poifenolok hatása a Makrofág migráció inhibitor faktor (MIF) enzimaktivitására Magyar Élettani Társaság LXIX. Vándorgyűlése, 2005. június 2-4. Budapest
11. **Molnár V.**, Garai J., Erős D., Örfi L., Lóránd T. 2-Arylidencycloalkanones as new possible ligands with tautomerase inhibitor potency. 2nd Bioorganic Chemistry Meeting, 23-24th June 2005, Budapest

## 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. Hippokratia 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., Zámbo 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. Arylidencycloalkanones 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

## 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 munkacsoportunk TDK hallgatóinak (Fónagy Eszter, Gabrieli Piroska, Németh Edit, Schumacher Edit és Vigh Éva), szorgalmasan munkájukért. Köszönöm a Kóréletani és Gerontológiai Intézet valamennyi munkatársának lelkes támogatását, Dr. Szelényi Zoltán professzor úrnak segítő támogatását és programvezetői munkáját, valamint Dr. Székely Miklós professzor úr biztatását és mindkettejük jelen dolgozatomhoz fűzött megfontolandó észrevételeit. Szelényi Zoltán professzor úrnak külön köszönöm jelen tézisfüzet angol verziójának segítőkész javítását.

A Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetből nagyon köszönöm Dr. Lóránd Tamásnak a kémiai vegyületek szintézisét, szerkezetük részletes és mindig türelmes magyarázását.

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, továbbá Dr. Szabó Árpád és Sándor Katalin Ph.D. hallgatóknak az állatkísérletekben nyújtott gyakorlati segítséget.

A Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumból hálával tartozom Dr. Seress László professzornak és Dr. Ábrahám Hajnalkának a morfológiai vizsgálatok során kapott szakmai irányításért, támogatásért. Továbbá Papp Emesének, Dr. Lórándné Mисley Juditnak és Domján Gáborné, Marcsinak a módszerek kivitelezésében nyújtott technikai segítségéért, és Belvárácz 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 rejtjelmeibe.

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 egyengette a védelem felé vezető utat.

Ugyancsak őszinte köszönettel tartozom a MiniComp Kft. munkatársának, Szakács Józsefnek, aki diákkörös korom óta 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, anyósom és keresztszüleim szeretetét, türelmét, megértését, szüntelen biztatását és a dolgozat elkészítéséhez az általuk biztosított nyugodt háttérrel.