

*A CypD szabályozza a szépszist és a daganatos sejtek
életképességét*

Doktori értekezés

Pribér János Krisztián

A doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs

Témavezető: Dr. Veres Balázs



Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

2015

Tartalomjegyzék

Szószedet	6
A sepszis	7
A sepszis általános meghatározása.....	7
A súlyos sepszis és a septicus sokk tünetei.....	7
A sepszist kiváltó mikroorganizmusok.....	8
A PAMP és DAMP és a receptoraik.....	8
A sepszist szabályozó proinflammatorikus és antiinflammatorikus citokinek.....	8
A sepszis, mint kétfázisú gyulladásos válaszreakció	9
A többszervi diszfunkciós szindróma tünetei	10
Egyéb elváltozások a hiperinflammatorikus szakaszban	10
A halál okai a hiperinflammatorikus szakaszban.....	11
A sepszis hipoinflammatorikus szakasza	11
A halál okai a hipoinflammatorikus szakaszban	11
A Toll-like receptor 4	12
A Toll-like receptorok általános jellemzői.....	12
A Toll-like receptor 4 jellemzői	13
A Gram-negatív LPS szerkezete	13
Az O-specifikus lánc felépítése	14
A poliszacharid mag felépítése	14
Az A-lipid felépítése	15
A makrofágok aktivációja	15
A makrofágok általános jellemzői.....	15
A makrofágok aktivációjának típusai	15
<i>A klasszikusan aktiválódott M1 típusú makrofágok.....</i>	<i>16</i>
<i>Az IgG komplex aktiválta M2 típusú makrofágok.....</i>	<i>16</i>
<i>Az IL-4 aktiválta M2 típusú makrofágok.....</i>	<i>17</i>
<i>Az LPS inszenzitív makrofágok</i>	<i>17</i>
A klasszikusan aktiválódott makrofágok jelátvittele.....	17
A MyD88-függő útvonal	18
A MyD88-független, TRIF-függő útvonal.....	19
Az NF- κ B transzkripciós faktor	19
A MAP kinázok	20
Az MKP1 foszfatáz	20
Az Akt.....	21
A FoxO transzkripciós faktorok	22
A mitokondrium	22
A mitokondrium általános jellemzői.....	22
A klasszikus mitokondriális pórus felépítése.....	23
A CypD	23
A külső mitokondriális membránban lévő pórusok	23
<i>A VDAC homooligomerek, valamint a VDAC és a Bax vagy a Bak heterooligomerek.....</i>	<i>23</i>
<i>A Bax és Bak homodimerek, homotrimerek vagy heterodimerek.....</i>	<i>24</i>
<i>A CypD szabályozza a külső membránjában lévő pórusok nyílását és az apoptózist.....</i>	<i>25</i>
A belső mitokondriális membránban lévő pórusok	25
Az ANT.....	25
Az FOF1 ATP szintáz dimerek	26
A foszfát karrier (PiC).....	26

<i>A CypD szabályozza a belső membránban lévő pórusok nyílását</i>	26
A CypD a belső pórusnyílásán keresztül szabályozza a mitokondrium szerkezetét és az oxidatív stresszt.....	27
<i>CypD kiváltja a mitokondrium duzzadását és a kriszták szerkezeti átalakulását</i>	27
<i>A CypD a belső pórusnyíláson keresztül szabályozza a mitokondrium ROS termelését</i> ..	28
<i>Az LPS kezelés hatására megjelenő nitrogén-monoxid gyök</i>	29
<i>Az oxidatív stressz funkciója az LPS-el kezelt makrofágokban</i>	29
<i>A CypD szabályozta oxidatív stressz kiváltja a mitokondrium feldarabolódását és a sejtek halálát</i>	30
<i>Az oxidatív jelátvitel</i>	30
Az ECSIT hatása a NADH dehidrogenáz ROS termelésére	31
A szepszis kezelése.....	31
Immunerősítő citokinek a szepszis kezelésében.....	33
A gyalladáscsökkentő polifenolok a szepszis kezelésében.....	33
<i>A rezveratrol</i>	33
<i>A ferulsav és a ferulaldehid</i>	34
<i>A rezveratrol a CypD foszforilációjával gátolja az mPTP nyílását</i>	35
A PARP-1 fehérje funkciója a szepszis kialakításában	35
<i>A PARP fehérjék biztosítják a DNS javítását és szabályozzák a génműködést</i>	35
<i>A PARP-1 fehérje fokozza az LPS indukálta gyulladást</i>	36
<i>A PARP-1 aktivációja a mitokondriális pórusok nyitásától kezdődően hozzájárul a ROS termeléshez, az apoptózishoz és a nekrozishoz</i>	36
Célkitűzések	38
Reagensok.....	39
Egerek	39
Sejtkultúrák	39
A PARP elcsendesítése siRNS technikával	40
A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) reakciót katalizáló fehérjék elcsendesítésére használt siRNS-t egy céggel terveztettük meg (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). A HepG2 sejteket siRNS-t tranziensen Lipofektaminnal 2000-el transzfektáltuk egy meghatározott médiumban (Opti-MEM I Reduced Serum Medium), melyet az Invitrogen cégtől rendeltünk. Ahhoz, hogy biztosítsuk a PARP fehérjék siRNS történő gátlását, 48 óránként háromszor transzfektáltuk a HepG2 sejteket siRNS-el. Valamint az utolsó transzfekciót követően, 40 óra múlva végeztük el a kísérletet.	40
Immunoblot	40
Az NF- κ B aktivációja	41
<i>A sejtmag fehérje kivonatának elkészítése</i>	41
<i>Az NF-κB DNS kötődésének a vizsgálata</i>	41
TNF- α mérés a hasüregi makrofág sejtek médiumában.....	41
A teljes sejt ROS termelésének meghatározása RAW264,7, HepG2 és a peritoneális makrofág sejtekben.....	42
A HepG2 sejtek életképességi vizsgálata.....	42
Sejtciklus analízisa áramlási citométerrel	43
Nitrit koncentráció meghatározása.....	43
A mitokondriális ROS termelés meghatározása.....	43
A mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi$ m) meghatározása a HepG2, Raw264,7 és a peritoneális makrofág sejtekben	43
RNS extrakció és kvantitatív reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (Q-RT-PCR).....	44
A mitokondrium belső pórusnyílásának meghatározása	45
Statisztikai analízis	45

Eredmények	45
A CypD hiánya gátolta az LPS indukálta mitokondriális depolarizációt a peritoneális makrofágokban	45
A CypD hiánya gátolta a mitokondrium belső pórusainak a nyílását az LPS-el kezelt peritoneális makrofágokban	47
A ferulaldehid gátolta az LPS indukálta mitokondriális depolarizációt a RAW264,7 sejtekben	49
A CypD hiánya gátolta az LPS indukálta ROS termelést a peritoneális makrofágokban és a tüdőben.....	50
A ferulaldehid gátolta az LPS indukálta ROS termelést a RAW264,7 makrofág sejtekben	51
A CypD hiánya gátolta az LPS indukálta NF- κ B aktivációt, az NF- κ B indukálta gének expresszióját a makrofág sejtekben.....	52
A ferulaldehid gátolta az LPS indukálta NF- κ B foszforilációját és az iNOS aktivitását a RAW264,7 makrofág sejtekben	54
A CypD hiányának hatása az LPS indukálta Akt1, valamint a FOXO-1 és FOXO-3a foszforilációjára peritoneális makrofágokban	55
A ferulaldehid gátolta a MAP kinázok aktivációját az LPS-el kezel RAW264,7 sejtekben	56
A ferulaldehid megnövelte a MKP1 foszfatáz expresszióját és fehérje szintjét az LPS-el kezelt RAW264,7 sejtekben.....	57
A ferulaldehid gátolta az Akt1 és a GSK-3 β foszforilációját az LPS-el kezel RAW264,7 sejtekben	58
Az IKK11 az apoptózist és a nekrozist a HepG2 sejtekben az mPTP-n keresztül is szabályozza.....	59
A PJ34 PARP gátló akadályozza a letális IK11 kezelést követően a mitokondrium mPTP nyílását jelző ROS termelését és fokozza a sejtek életképességét	61
A PJ34 PARP gátló az IK11 kezelést követően az Akt a JNK aktivációjának gátlásán keresztül gátolja a HepG2 sejtek osztódását és váltja ki a sejtek halálát	62
Diszkusszió.....	64
A CypD számos kórfolyamatban kiváltja az mPTP nyílását.....	64
A CsA nem specifikus gátlószere a CypD fehérjének.....	64
A CypD hiánya és a ferulaldehid az mPTP nyíláson keresztül gátolja a mitokondrium depolarizációját.....	65
A CypD hiánya és a ferulaldehid a belső pórusnyílásokon keresztül gátolja a mitokondriális és az extramitokondriális ROS termelését.....	66
A CypD hiánya a peritoneális makrofágokban ROS termelésének gátlásán keresztül csökkentette le az NF- κ B p65 aktivációját.....	67
A ferulaldehid főként az antioxidáns hatásán keresztül gátolta a ROS termelést és ebből adódóan NF- κ B p65 aktivációját.....	67
A ferulaldehid főként az MKP1 aktivációján keresztül gátolta a MAP kinázok foszforilációját	68
A ferulaldehid nem a GSK-3 β fehérjén keresztül szabályozza az mPTP nyílását.....	69
A CypD fehérje hiánya nem a ROS csökkentésén keresztül hatott az Akt1 aktivációjára ...	69
A HepG2 sejtekben az IK11 a PARP aktivációján keresztül váltja ki az mPTP nyílását, és a JNK-2 aktivációját valamint az Akt1 inaktivációját és a sejtek apoptózisát, nekrozisát	70
Konklúzió	71
Irodalomjegyzék	73

Publikációk listája

Ez a dolgozat a következő három cikkre épül.

Priber J, Fonai F, Jakus PB, Racz B, Chinopoulos C, Tretter L, Gallyas F Jr, Sumegi B, Veres B. Cyclophilin D disruption attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in primary mouse macrophages. *Biochem Cell Biol.* 2015; 23:1-10.

impakt faktor: 2,152 (2014)

hivatkozás: 1

Tucsek Z, Radnai B, Racz B, Debreceni B, Priber JK, Dolowschiak T, Palkovics T, Gallyas F Jr, Sumegi B, Veres B. Suppressing LPS-induced early signal transduction in macrophages by a polyphenol degradation product: a critical role of MKP-1. *J Leukoc Biol.* 2011; 89 (1):105-11.

impakt faktor: 4,992 (2011)

hivatkozás: 17

Radnai B, Antus C, Racz B, Engelmann P, Priber JK, Tucsek Z, Veres B, Turi Z, Lorand T, Sumegi B, Gallyas F Jr. Protective effect of the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ34 on mitochondrial depolarization-mediated cell death in hepatocellular carcinoma cells involves attenuation of c-Jun N-terminal kinase-2 and protein kinase B/Akt activation. *Mol Cancer.* 2012; 11:34.

impakt faktor: 5,134 (2012)

hivatkozás: 3

További cikk:

Fonai F, Priber JK, Jakus PB, Kalman N, Antus C, Pollak E, Karsai G, Tretter L, Sumegi B, Veres B. Lack of cyclophilin D protects against the development of acute lung injury in endotoxemia. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1852(12):2563-2573.

impakt faktor: 4,88 (2014)

hivatkozás: 0

összes impakt faktor: 17,158

összes hivatkozás: 21

Szószerdet

Akt/ PKB protein kinase B	NF-κB nuclear transcription factor-kappa
ANT adenine nucleotide translocator	NO nitric-oxide
AP-1 activator protein-1	OMP outer membrane pore
ATF-2 activating transcription factor-2	p38 p38 mitogen-activated protein kinase
Bak Bcl-2 homologous antagonist/killer	PAMP pathogen-associated molecular pattern
Bax Bcl-2-associated X protein	PBS phosphate-buffered saline
Bcl2 B-cell lymphoma 2	PDK1 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
Bclxl BCL2-like 1 isoform 1	PDK2 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 2
COX-2 cyclooxygenase-2	PH domain pleckstrin Homology domain
Crm1 (chromosomal region maintenance)/exportin 1	PI-3K phosphoinositide-3 kinase
CTCF CCCTC-binding factor	PIP2 phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate
CypD cyclophilin D	PIP3 phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
ECSIT evolutionarily conserved signalling intermediate in Toll pathways	PPIF peptidylprolyl isomerase F
EDTA ethylenediaminetetraacetic acid	PRR pathogen recognition receptor
Egr-1 early growth factor response-1	PTEN phosphatase and tensin homologue
ERK1/2 extracellular signal-regulated kinase	RNS reactive nitrogen species
FA ferulaldehyde	ROS reactive oxygen species
FOXO forkhead box gene group	SAPK stress-activated protein kinase
HBSS Hank's balanced salt solution	SIRS systemic inflammatory response syndrome
IFN-γ interferon-γ	SIRT1 sirtuin 1
IKK IκB kinase	SOD superoxide dismutase
IL interleukin	TAB1 TAK1-binding protein1
IMP inner membrane pore	TAB2 TAK1-binding protein2
iNOS inducible NO-synthase	TAK1 TGF-β-activated kinase 1
IRAK interleukin-1 receptor-associated kinase	TBK1 TRIF/TANK-binding kinase 1
IκB inhibitor of NF-κB	TIR Toll/IL-1 receptor
JNK c-Jun N terminal kinase,	TIR Toll/IL-1 receptor
LBP lipopolysaccharide binding protein	TIRAP toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein
LPS lipopolysaccharide,	TLR toll-like receptor
MAPK mitogen-activated protein kinase	TNF-α tumor necrosis factor-α
MD-2 myeloid differentiation protein-2	TRAF-6 TNF receptor-associated factor-6
MKK MAPK kinase	TRAM TRIF-related adaptor molecule
MKKK MKK kinase,	TRIF TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
MKP MAP kinase phosphatase	VDAC voltage-depedent anion channell
mPTP mitochondrial permeability transition pore	XRCC1 X-ray cross-complementing gene 1
mTORC2 mTOR complex 2	
MyD88 myeloid differentiation primary response gene 88	
NAC N-acetyl-L-cysteine	

A szepszis

A szepszis általános meghatározása

A szepszis és a következményes kórfolyamatok okozzák a legtöbb halálesetet az általános intenzív betegellátás során. Ennek oka, hogy a szepszis hatására aktiválódó immunrendszer működése kikerül a szervezet ellenőrzése alól. Ennek következtében olyan mértékben felerősödnek a szervezetben zajló – normális körülmények között a beteg gyógyulását elősegítő - gyulladásos reakciók, amelyek már károsítják a szervezetet, és a betegek halálát okozhatják. Ha a páciensek halála nem következik be, akkor a szervek károdsodása a későbbi immunhiányos szakaszban megjelenő gyulladásokkal együtt kiválthatja a beteg halálát. Egy felmérés szerint Amerikában mintegy 750000 súlyos szeptikus eset fordul elő évente és ebből 225000 halálos kimenetelű. Egy becslés szerint évente 19 millió eset fordulhat elő világszerte. A betegség többnyire az idősebb korú, legyengült immunrendszerű betegeket támadja meg, de előfordulhat a mindinkább esendő állapotú betegeken végzett műtétek szövődményként is. A szeptikus betegeket jelenleg az intenzív osztályokon főként antibiotikumokkal, vagy antifungális szerekekkel kezelik. Utóbbit abban az esetben alkalmazzák, ha a betegséget Candida fajok okozzák. Szepszist emellett még különböző vírusok is kiválthatnak. A sajtóban egyre többet hallhatunk multirezisztens baktériumok megjelenéséről, melyek esetében az antibiotikum kezelés már nem nyújthat védelmet. Így a világszerte előforduló szeptikus betegek száma, valamint az antibiotikum kezelés jövőbeni hatékonyságának csökkenése miatt, egyre sürgetőbbé válik egy újabb, és hatékonyabb gyógymód megtalálása (1-50).

A szepszis általános meghatározása

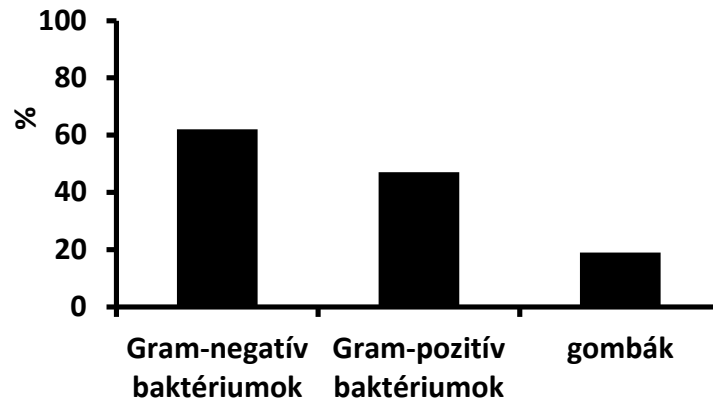
A szepszis a fertőzések hatására megjelenő kóros mértékű szisztémás gyulladásos válaszreakció, amely együtt jár az immunrendszer túlzott működésével (1, 2). Azonban a teljes szervezetre kiterjedő fokozott gyulladás lecsengése után egy immunológiailag gyenge állapot alakulhat ki, melyben a gyulladásos folyamatok erőteljesen gátoltak. Ebben a szakaszban a megjelenő fertőzések okozzák a beteg halálát (3-17). A szepszis a fentiekből adódóan valójában egy kétfázisú betegségnek tekinthető, melynek az első szakaszában erőteljes szisztémás gyulladás, a második szakaszában pedig a gyulladás gátlása figyelhető meg. A szepszis első fázisában a következő tünetek jelennek meg: magas láz (38,5 C felett), forró és száraz bőr, azonban előfordulnak olyan esetek is, amikor a testhőmérséklet kórosan alacsony (35,5 C alatt). Emellett még megfigyelhetőek a következő szimptómák is, nevezetesen: a szapora légzés (hiperventilláció), ami percenként több mint 20 légvételt jelent, a pulzusszám 90/perc érték fölé növekedése (tahikardia), az alacsony vérnyomás (hipotenzió) és a fehérvérsejtek számának növekedése (leukocitózis, 12 000 sejt/mm³) vagy éppen csökkenése (leukopénia, 4000 sejt/mm³) (18, 19).

A súlyos szepszis és a szeptikus sokk tünetei

A szepszis felbontható két független kórképre, a szeptikus sokkra és a súlyos szepszisre. A kettő elhatárolása az alapján történik, hogy a fent felsorolt tünetek mellett, milyen jellegzetes tünet fordul még elő. Így szeptikus sokkról akkor beszélünk, ha acidózis, intravénás folyadékpótlással nem kezelhető vérnyomáscsökkenés, valamint csökkent hipoperfúzió jelenik meg, azaz a keringési rendszer elégtelen működése áll fenn. Súlyos szepsziszről pedig akkor beszélünk, ha akut több szervet érintő elégtelenség jelenik meg (2). A halál utáni vizsgálatok során kiderült, hogy a halálozásokat legnagyobb mértékben a több szerv együttes működésének az elégtelensége okozza (51,5 %), míg a keringési rendszer elégtelensége a halálozások 35,3 %-árét felelős (20).

A szepszist kiváltó mikroorganizmusok

A szepszis első szakasza kialakulhat elsődleges vagy - az egészségügyi beavatkozások (műtétek) során megjelenő - másodlagos fertőzések hatására. Az esetek felében a tüdőgyulladás a leggyakoribb oka, de a hasüregi és a húgyúti fertőzések során is kialakulhat (21-24). A fertőzéseket a Gram-negatív (*Escherichia coli*, *Klebsiella* fajok, *Pseudomonas aeruginosa*) a Gram-pozitív (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) baktériumok és gombák (*Candida* fajok) okozzák (23, 25). A Gram-negatív baktériumok a megbetegedések 62%-áért, a Gram-pozitív baktériumok a 47%-áért, a gombák a 19%-áért felelősek (24).



1. ábra A szepszis kiváltó mikroorganizmusok százalékos eloszlása.

A PAMP és DAMP és a receptoraik

A fertőzésekért a mikroorganizmusok konzervált struktúrái, a patogén-asszociált molekuláris mintázatok felelősek (PAMP, pathogen-associated molecular pattern). Ilyen például a Gram-negatív baktériumok endotoxinja, a lipopoliszacharid (LPS) vagy a Gram-pozitív baktériumok exotoxinjai, a teichonsav és a muramil peptid képes kiváltani szepszist. A szepszist nemcsak a PAMP, hanem az gazdaszervezet szöveti sérülése során felszabaduló intracelluláris molekulák, az úgynevezett sérülés-asszociált molekuláris mintázat komponensei (DAMP, damage associated molecular patterns) is kiválthatják. A PAMP és a DAMP a mintázat-felismerő receptorokhoz kapcsolódva (PRR, pattern recognition receptor) fejtik ki a hatásukat. Ezeknek a receptoroknak négy fő osztályát különíthetjük el, a Toll-like receptorokat, a C-típusú lektin receptorokat (C-type lectin receptors), a retinsavval indukálható gén 1-szerű receptorokat (retinoic acid inducible gene 1-like receptors) és a nukleotidkötő oligomerizációs alegységnek tűnő receptorokat (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors) (26).

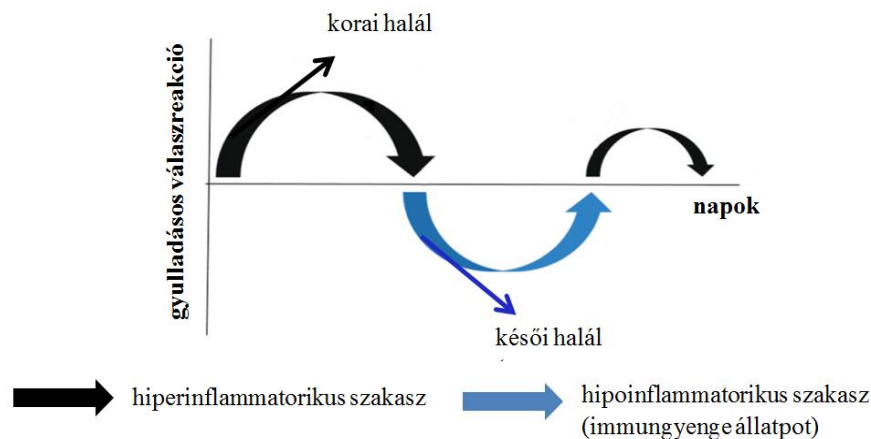
A szepszist szabályozó proinflammatorikus és antiinflammatorikus citokinek

A szepszis egy kétfázisú gyulladásos válaszreakció, melyet a TLR mintázat-felismerő receptorok aktiválását követően termelődő citokinek szabályoznak. Citokineket számos immunsejt (monociták makrofágok, dendritikus sejtek, B- és T-limfociták egyes altípusai) és szerv (pl. tüdő, máj, lép, szív) szekretálja (27-31). A citokinek rövid életidejű, de rendkívül mozgékony polipeptidok, melyek a szepszis hatásos szabályozó anyagai. Kapcsolatot teremtenek, illetve a kommunikációt biztosítják az immunsejtek és a belső szervek között, azok működését meghatározva. A citokinek esetében elkülönítünk gyulladást kialakító proinflammatorikus, és gyulladást csökkentő antiinflammatorikus citokineket. A proinflammatorikus citokinek közé tartozik, a TNF- α (tumor necrosis factor- α), az IL-1 β (interleukin-1 β) és az interleukin-6 (IL-6). A gyulladás gátlását biztosító legfontosabb

antiinflammatorikus citokin az interleukin-10 (IL-10). A szepszis során a proinflammatorikus és antiinflammatorikus citokinek egyaránt egy időben szekretálódnak, de arányuk a kórfolyamat előre haladásával folyamatosan változik. Hatásuk attól függ, hogy a citokinek mely típusa van túlsúlyban. A proinflammatorikus citokinek túlsúlya, azokat a folyamatokat indítja el, melyek a kórokozók eltávolításáért és a szövetek, szervek károsodásáért is felelősek. A gyulladást gátló, antiinflammatorikus citokinek pedig elősegítik a szövetek regenerálódását, és gátolják a proinflammatorikus citokinek hatását (32).

A szepszis, mint kétfázisú gyulladási válaszreakció

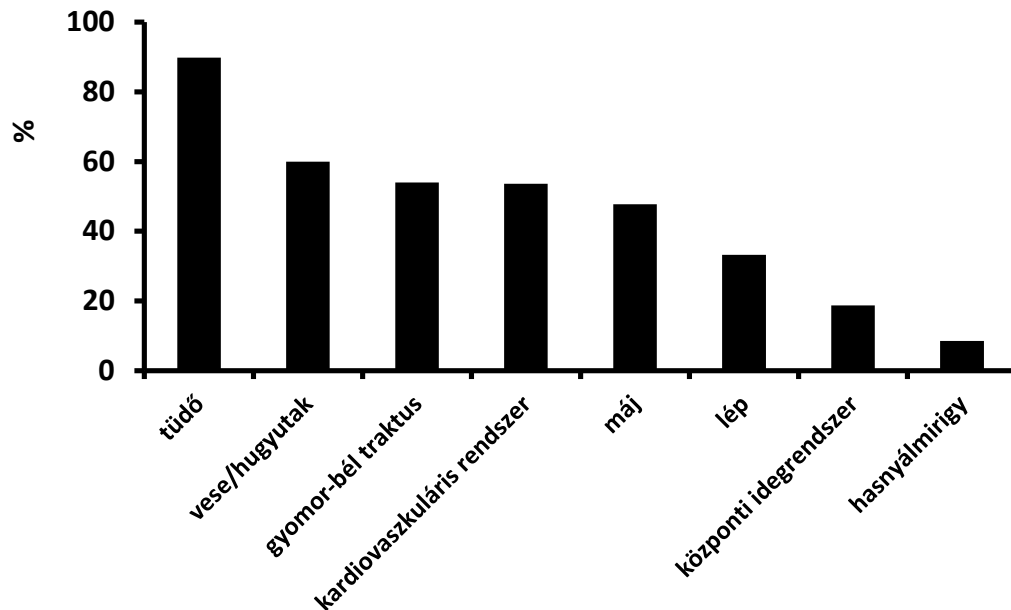
Mint már említettem a szepszis egy kétfázisú betegségnek tekinthető, hiszen egy hiperinflammatorikus szakasszal kezdődik, amit egy hipoinflammatorikus szakasz követ, ha a beteg nem gyógyul meg, illetve ezek a szakaszok váltakoznak. A hiperinflammatorikus szakaszban a proinflammatorikus citokinek túlzott termelésüknek köszönhetően kialakítják a szepszis tüneteit, azaz több szerv funkciója károsodhat a szervezet, szöveteket érintő károsodásnak köszönhetően. A hipoinflammatorikus szakaszban, a vérben a gyulladást kiváltó citokinek szintje jelentős mértékben lecsökken, míg az antiinflammatorikus citokinek szintje nem változik (10). Így a gyulladást gátolt. Előfordul azonban az is hogy a hipoinflammatorikus szakaszban az antiinflammatorikus citokinek szekréciója egyes szervekben lecsökken (3). A szepszis két fázisát még az is elkülöníti, hogy a hiperinflammatorikus szakaszban az immunrendszer működése túlzott, míg a hipoinflammatorikus szakaszban egy immun gyenge állapot jelenik meg (3), ami a további fertőzések megjelenéséhez vezethet, és a betegek halálát okozhatja (12-15). A beteg korai halála bekövetkezhet a hiperinflammatorikus szakaszban a túlzott gyulladásnak köszönhetően, vagy a késői halála a hipoinflammatorikus szakaszban, nozokimiális fertőzések vagy a szervezetben régóta jelen lévő kevésbé virulens, opportunisták fajok vagy látens vírusok újraaktiválódásának köszönhetően. A betegség lefolyása, az immunfolyamatok erőssége és időtartama függ a kórokozóktól, az életkortól, a fizikai állapottól, a további fertőzésektől és az egyéni genetikai különbségektől. Ebből adódóan a hiperinflammatorikus és hipoinflammatorikus szakaszok eltérő számban ismétlődhetnek meg, miközben a klinikai tünetek erősödnek vagy csökkennek, míg a beteg meg nem gyógyul vagy meg nem hal (2. ábra).



2. ábra A szepszis, mint egy kétfázisú gyulladási válaszreakció. A szepszis során proinflammatorikus és antiinflammatorikus folyamatok váltják egymást. Így kezdetben kialakul egy hiperinflammatorikus szakasz, melyet később egy hipoinflammatorikus (immunhiányos) szakasz követhet. A beteg korai halála bekövetkezhet a hiperinflammatorikus szakaszban a túlzott gyulladásnak köszönhetően, vagy a késői halála a hipoinflammatorikus szakaszban, nozokimiális fertőzések vagy a szervezetben előforduló kevésbé virulens, opportunisták fajok vagy látens vírusok újraaktiválódásának köszönhetően.

A többszervi diszfunkciós szindróma tünetei

A sepszis hiperinflammatorikus szakaszában a TNF- α és az IL-1 β hatására megjelenik a súlyos sepszisre jellemző többszervi diszfunkciós szindróma. Itt érdemes megemlíteni, hogy ha a szervek elégtelen működése, ha négynél több szervet érint, akkor a halálozás 85% fölé emelkedik. A sepszisben elhunyt betegek vizsgálata során kiderült, hogy a többszervi diszfunkció esetében az elváltozások legnagyobb részben a tüdőt (89,8 %), kisebb mértékben a veséket és húgyutakat (60%), a gyomor-bél traktust (54%), a kardiovaszkuláris rendszert (53,6%), a májat (47,7%), a lépét (33,2%), a központi idegrendszert (18,7%) és a hasnyálmirigyet érintik (8,5%) (20).



3. ábra Posztmortem belső szervi elváltozások százalékos értékei a többszervi diszfunkciós szindróma esetén.

A légzési rendszer esetében akut tüdőgyulladás (ALI) vagy légúti distressz szindróma (ARDS) alakul ki (33,36, 37). A keringési rendszert érintő elváltozás esetében pedig alacsony vérnyomás vagy emelkedett szérum laktát szint jelenik meg (34). A fentiek mellett az agy és a vese működése is gyakran károsodik. A központi idegrendszeri zavarként, kábultság jelenik meg. Emellett megfigyelhető a perifériás idegek működési zavara (polineuropátia) (35), melynek következményeként nem lesz megfelelő az agy és az izmok, a bőr, a zsigerek vagy az erek közti kommunikáció, ami koordinációs zavarokhoz, fájdalomhoz, zsibbadáshoz, és érzéketlenséghez vezet. Az izomműködési zavarok (miopátia) pedig izomgörcsöket, és az izmok remegését okozzák (35). Az akut veseelégtelenségnek köszönhetően pedig csökken a vizelet mennyisége, valamint a szérum kreatinin szintje megemelkedik. A bélizmok bénulásából adódóan bélelzáródás (paralitikus ileusz) is bekövetkezhet.

Egyéb elváltozások a hiperinflammatorikus szakaszban

A súlyos sepszis szinte mindig együtt jár a disszeminált intravaszkuláris véralvadással (38), azaz a fibrin lerakódásával az erekben, melyet a szöveti faktorok (transzmembrán glikoproteinek) váltanak ki. Szöveti faktorokat termelnek az aktivált makrofágok az erek belső falát borító endotél sejtek. Ezeknek a szöveti faktoroknak a termelését, és az erekben végbemenő véralvadást a proinflammatorikus citokinek serkentik (IL-1 β , TNF- α , IL-6) míg az antiinflammatorikus citokin (pl.: IL-10) gátolja (39-41). A TNF- α például kiváltja az endotél sejtek plazminogén aktivátor inhibitor 1 (plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)

termelését, ami a fibrinolízist gátolja, így elősegíti a véralvadást az erekben (41). Ugyanakkor a természetes véralvadásgátlók (antitrombin) gátolják a monociták TNF- α termelését (42). A véralvadás gátlása pedig gátolja a proinflammatorikus citokinek termelését (43). Így a véralvadás és a proinflammatorikus és antiinflammatorikus citokineknek az aránya között szoros összefüggés áll fent. Az intravaszkuláris véralvadáshoz hozzájárul még az antikoaguláns mechanizmusok csökkenése, ami magában foglalja a protein C rendszer és az antitrombin csökkent működését, valamint a fibrinolitikus rendszer zavarát (38). Ezek mellett a vérben megemelkedik a máj károsodását jelző aminoszterázok (alanin transzamináz, aszpartát transzamináz) szintje, valamint a vérlemezke szám lecsökken (trombocitopénia). A megváltozott glikémiás szabályzás, és a mellékvesék diszfunkciója is megfigyelhető. A tiroid, pajzsmirigy hormonok szintje a szérumban lecsökken (eutireoid betegség szindróma) (44).

A halál okai a hiperinflammatorikus szakaszban

A súlyos szepszis során a szervek nem megfelelő működéséért a legnagyobb mértékben a szervek nem megfelelő oxigén és tápanyag ellátása tehető felelőssé. Ezekért a következő tünetek együttesen felelősek: az alacsony vérnyomás, a mikro erek trombózisa (intravaszkuláris disszeminált koaguláció), a vaszkuláris endotélium sérüléséből adódóan a szubkután területeken és a testüregekben megjelenő ödémák és az akut légúti distressz szindróma (45). A nem megfelelő oxigén ellátás ugyanakkor kiváltja a mitokondriumok szabadgyök termelését is (46), amely a mitokondriumok működésének, energiatermelésének további csökkenéséhez, a mitokondriális hálózat károsodásához, és a mitokondriális energiaellátás csökkenéséhez vezet. Annak ellenére, hogy a szeptikus betegek posztmortem vizsgálata során megjelennek az apoptózis és nekrozis tünetei is (47, 48), mégsem a sejthalál okozza a szervek működésének a leállítását (4). Egy új teória alapján a sejtek úgy mond hibernálnának a szepszis során, és ez okozza a szervek működésének a leállítását és a halált (49, 50).

A szepszis hipoinflammatorikus szakasza

Abban az esetben, ha a szeptikus beteg túléli a kezdeti hiperinflammatorikus szakaszt, de nem gyógyul meg, belép egy hipoinflammatorikus szakaszba, melyben a gyulladást gátló folyamatok erősödnek fel. Ez abból adódik, hogy az immunsejtek (monociták, makrofágok), és a belső szervek (pl.: tüdő, lép) proinflammatorikus citokin termelése lecsökken (3, 9-11). Emellett megjelennek a fagociták szöveti károsodásokat csökkentő gyulladást gátló alakjai is (3), valamint a gyulladás csökkentésében részt vevő regulációs T-sejtek és a mieloid eredetű szupresszor sejtek száma megnövekszik. A gyulladást neurális mechanizmusok is csökkenthetik (16). Ilyen az úgynevezett ideggyulladásos reflex, mely során noradrenalin szabadul fel a lépben, ami a CD4⁺ T sejtek egy csoportjának acetilkolin termelését váltja ki. Az acetilkolin a makrofágok receptoraihoz ($\alpha 7$ kolinerg) kapcsolódva, elnyomja a gyulladás kialakításában elengedhetetlen proinflammatorikus (IL-1 β , TNF- α) citokinek termelését (17). Ebben a fázisban az immunműködés nemcsak, hogy nem áll helyre, hanem egy immungyenge állapot alakul ki, amelyért az immunsejtek (CD4⁺ Th1 és Th2, CD8⁺ citotoxikus T-sejt, dendritikus sejt) megnövekedett apoptózisa, csökkent aktivitásuk és a szervek immunszuppresszáns jelátviteli folyamatainak a felerősödése felelős (3-8).

A halál okai a hipoinflammatorikus szakaszban

A gyulladást gátló folyamatoknak a felerősödéséből és az immunrendszer gyengeségéből adódik, hogy a szervezetben előforduló kevésbé virulens és opportunistá fajok (*Stenotrophomonas* spp, *Acinetobacter* spp, *Enterococcus* spp, *Pseudomonas* spp és *Candida* spp) (12, 13), valamint az újra aktiválódott látens vírusok (Cytomegalovírus, Herpes simplex

virus) (14, 15) újabb fertőzéseket alakítanak ki. Ebben a szakaszban nemcsak a magában a szervezetben régóta jelen lévő kórokozók erősödhetnek fel, hanem a kórházban előforduló mikroorganizmusok is másodlagos fertőzéseket alakíthatnak ki. Ez az újabb fertőzés fog elvezetni a beteg haláláig. A szervek működésének leállításáért szintén nem az apoptózis vagy a nekrozis felelős, hanem a sejtek működésének leállása, hibernálódása.

A fentiekből adódóan a szepszis nem egy egyszerű kétfázisú modell, mivel a betegség lefolyása, az immunfolyamatok erőssége és időtartalma függ a kórokozóktól, az életkortól, a fizikai állapottól, a további fertőzésektől, illetve az egyéni genetikai különbségektől. Ebből következően a hiperinflammatorikus és hipoinflammatorikus szakaszok eltérő számban ismétlődhetnek meg, miközben a klinikai tünetek erősödnek vagy csökkennek.

A Toll-like receptor 4

A Toll-like receptorok általános jellemzői

Mint már a fentiekben említettem a szepszis kiváltják az immunsejtek valamint a szervek mintázatfelismerő Toll-like receptoraihoz (TLR) kapcsolódó patogén-asszociált molekuláris mintázatok. A Toll-like receptorok I-es típusú transzmembrán fehérjék, amelyeknek C-terminális vége intracellulárisan, míg N-terminális vége extracellulárisan helyezkedik el, és közöttük egy transzmembrán régió található. Az extracelluláris rész leucinben gazdag ismétlődéseket tartalmaz, mely felelős a PAMP felismeréséért. Az intracelluláris részük rendelkezik a toll-interleukin 1 receptor (TIR) alegységgel, mely a jelátvitelt szabályozza (51). A Toll-like receptor (TLR) család tagjai a természetes immunrendszer sejtjeinek (pl.: monociták, makrofágok, dendritikus sejtek) proinflammatorikus citokin, kemokin és kostimulátor molekuláinak expresszióját váltják ki (52). A citokinek, a kostimulátorok és az antigén prezentációjuk mellett az adaptív immunválasz irányát határozzák meg. A Toll-like receptorok különbözőképpen expresszálódnak különböző sejteken. Így például több ezer molekula található a monocita sejteken, és csak pár száz a dendritikus sejteken (53). A TLR családnak jelenleg 10 humán, 12 egerekben (51) megtalálható receptora ismert. A TLR1-9 receptor konzervált mind a két fajban. A TLR10 egerekben, míg a TLR11, a TLR12 és a TLR13 az emberekben nem található meg (51). Az eltérő TLR receptorokhoz eltérő mikrobiális (baktérium, vírus, parazita, gomba), exogén eredetű ligandok kötődnek (51, 54, 55, 52, 56, 57) (4. ábra). A TLR1, a TLR2, a TLR4-6 és a TLR11 receptorok a sejtfelszínen helyezkednek el, és a mikrobiális membrán komponenseket ismerik fel (51), míg a TLR3, a TLR7, a TLR8 és a TLR9 receptorok az intracelluláris vezikulumokban foglalnak helyet (endoplazmatikus retikulum, endoszóma, lizoszóma, endolizoszóma) és különböző mikrobiális nukleinsavakat ismernek fel (51).

TLR	elhelyezkedés	exogén ligandok
TLR1	sejtfelszín	peptidoglikán
TLR2	sejtfelszín	Gram-pozitív baktériumok peptidoglikánja és lipoteichonsava
TLR3	intracelluláris vezikulum	virális duplaszálú RNS
TLR4	sejtfelszín	Gram-negatív baktériumok lipopoliszacharidja (LPS), Respiratory syncytial vírus fúziós fehérjéje, Streptococcus pneumoniae pneumolizinje
TLR5	sejtfelszín	bakteriális flagellin
TLR6	sejtfelszín	bakteriális lipopeptidek

TLR	elhelyezkedés	exogén ligandok
TLR7	intracelluláris vezikulum	virális egyszálú RNS, imidazoquinolin származékok
TLR8	intracelluláris vezikulum	virális RNS guaninban gazdag oligonukleotidjai
TLR9	intracelluláris vezikulum	virális és bakteriális DNS nem metilált CpG motívumai
TLR11	sejfelszín	flagellin, profilin
TLR12	sejfelszín	profilin

4. ábra Toll-like receptorok exogén ligandjai. A Toll-like receptor családba jelenleg 13 receptor tartozik, melyek eltérő exogén ligandok hatására aktiválódnak.

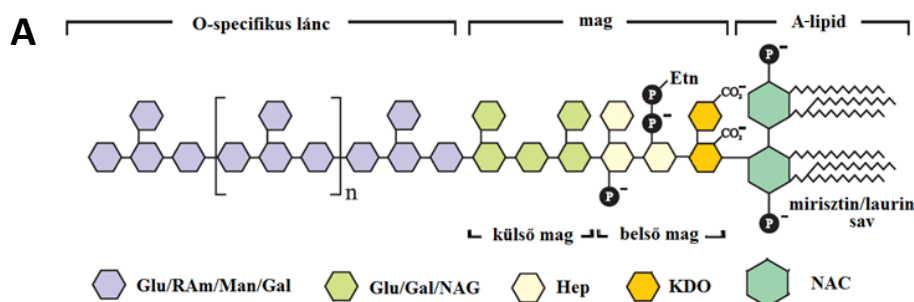
A Toll-like receptorok nemcsak exogén ligandokat ismernek fel, hanem a szövetek sérülésekor felszabaduló endogén, intracelluláris sejtalkotórészeket is, amelyek fertőzés hiányában is immunválaszt váltanak ki. Ez utóbbinak a célja természetesen a szövetek regenerálása és a sérült sejtörmelék eltávolítása, de emellett kiválthatnak autoimmun folyamatokat is (58). Például a TLR4 receptor endogén ligandjai közé tartozik az extracelluláris mátrix sérülésekor, lebontásakor felszabaduló fibronectin és a hialuronsav. Az extracelluláris mátrix sérülése pedig a szepszis egyik velejárója.

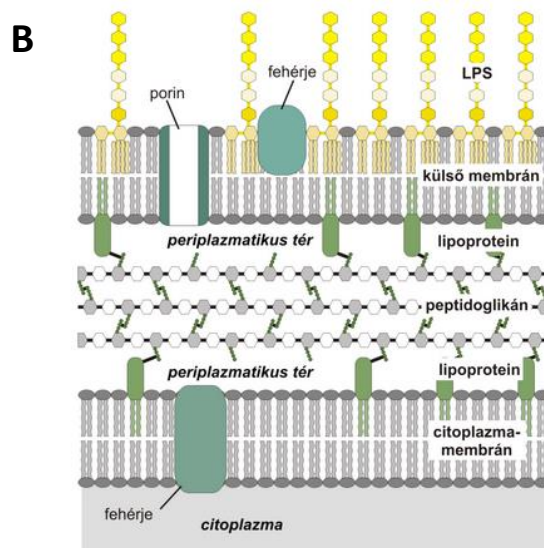
A Toll-like receptor 4 jellemzői

A TLR4 megtalálható különböző immunsejteken, monocitákon, makrofágokon, dendritikus sejteken, garnaucitákon, CD4⁺ T-sejteken, CD8⁺ T-sejteken és kis mértékben B limfocitákon. TLR4 receptorral találkozunk még tüdő, lép, máj és szívizom sejtjein, a csontszövetben, a simaizomsejteken, az epiteliális sejteken, az endoteliális sejteken valamint a perifériás idegsejteken (59-66). A TLR4 receptor egyik exogén ligandja a Gram-negatív baktériumok lipopoliszacharidja (LPS), mely a receptorhoz kapcsolódva kiváltja a szepszis tüneteinek a megjelenését (67), a gyulladással kapcsolatos citokinek, kemokinek szekrécióját, a szabadgyökök termelését és akár az apoptózist is.

A Gram-negatív LPS szerkezete

A szepszist kiválthatja a Gram-negatív taxonban trarozó *Escherichia coli* patogén-asszociált molekuláris mintázata, azaz az LPS vegyülete is. A Gram-negatív taxonban előforduló baktérium fajok eltérő felépítésű lipopoliszachariddal (LPS) rendelkeznek, így az LPS szerkezete egyáltalán nem tekinthető egységesnek. A Gram-negatív baktériumok sejtfalát egy vékony peptidoglikán réteg alkotja, ezen kívül található a külső membrán. Az LPS a külső membránban helyezkedik el, és sejtől kifelé tekint (5. A ábra). A kémiai szerkezet és biológiai aktivitás tekintetében az LPS három részre osztható, az első rész az A-lipid, a második egy rövid és nem-ismétlődő oligoszacharid mag, a harmadik pedig egy disztális poliszacharid (O specifikus lánc). A LPS-t a külső membránhoz az A-lipid kapcsolja (5. B ábra) (68-70).





5. ábra. A Gram-negatív baktériumok sejtfa és LPS szerkezete. A sejtfa külső membránjában helyezkedik el a lipopoliszacharid (LPS) molekula. A külső membránhoz az A-lipid kapcsolja (B). Az Enterobacteriaceae családban a lipopoliszacharid (LPS) három részre tagolható, az O-specifikus lánccra, a magra és az A-lipidre (A). Az O-specifikus lánc egyes fajok esetében hiányzik. A poliszacharid mag, a központi heterooligoszacharid régió, felosztható egy külső és egy belső magra, de szerkezeti különbségek csak a külső magra jellemzőek. Az A-lipid az LPS meglehetősen konzervatív része, amely felépítését tekintve nagy variabilitással rendelkezik a törzsek és a fajok között. Maga az A-lipid felelős az LPS endotoxikus hatásáért.

Az O-specifikus lánc felépítése

Az O-specifikus lánc egy oligoszacharid polimer, amelyet ismétlődő egységek alkotnak (5. B ábra). Az ismétlődő egységeket glükóz (Glu), ramnóz (Ram), mannóz (Man) és galaktóz (Gal) építi fel. Ezeknek az ismétlődő egységeknek a száma egytől nyolcig terjedhet. Egy szerotípuson belül, az ismétlődő egységek törzsenként különböznek. Ez azt jelenti, hogy különbözik a monoszacharidok sorrendje, a közöttük lévő kötés típusa vagy az, ahogy a monoszacharidok egymást helyettesítik (69).

A poliszacharid mag felépítése

A poliszacharid mag a központi heterooligoszacharid régió, amely felosztható egy külső és egy belső magra (5. B ábra). Az O-specifikus lánccal ellentétben a mag szerkezetileg egységesebb. A szerkezeti különbségek elsősorban a külső mag régiójában figyelhetők meg. A belső mag jól konzervált a Gram-negatív taxonban. A különböző *E. Coli* szerotípusoknál a külső mag közös hexózokat tartalmaz, mint a D-glükóz (Glu), a D-galaktóz (Gal) és az N-acetil-D-glükózamin (NAG) (69). A belső mag jellegzetes LPS specifikus összetevőket tartalmaz, ilyen a 2-keto-3-dezoxi-oktanoilsav (KDO) és a heptóz (Hep). Az utóbbi főként L-glicero-D-manno konfigurációban fordul elő. A heptózt és 2-keto-3-dezoxi-oktanoilsavat töltéssel rendelkező csoportok helyettesíthetik, mint a foszfát, a pirofoszfát, a 2-aminoetilfoszfát, a 2-aminoetilpirofoszfát csoport vagy az etanolamin. Ezek a töltött csoportok a belső magban negatív töltésű agglomerátumokat alkotnak, ami a sejt felszínének környezetében kétértékű kationok (Ca^{2+} , Mg^{2+}) felhalmozódásához vezet. Ez a jelenség azonban élettani jelentőséggel is bír, hiszen a kationok a külső membrán szerkezeti és működésbeli épségének fenntartásához járulnak hozzá (69). A kísérleteink során megfigyeltük, hogy intraperitoneális LPS-el kezelt egerek májsejtjeinek sejt szerveit és a citoplazmát nem lehetett megfelelően elválasztani. Ennek hátterében a sejt membrán szerkezetének a megváltozása, valamint az extracelluláris mátrix károsodása állhatott.

Az A-lipid felépítése

Az A-lipid felelős a Gram-negatív baktériumok patofiziológiás hatásáért (5. ábra B). A Gram-negatív baktériumok többségében az A-lipid szacharid gerincét két glükózamin egység alkotja, melyek β (1 \rightarrow 6) glikozidos kötéssel kapcsolódnak össze. A glükózaminok aminocsoportjait (2 és 2' -helyzetben) és a hidroxil-csoportjait (3 és 3' -helyzetben) általában 3-hidroxizsírsavak helyettesítik, ami leggyakrabban a 3-hidroxitetradekánsav (1. ábra). A hidroxisavakkal általában észter kötést alakítanak ki az el nem elágazó és telített zsírsavaknak a hidroxilcsoportján keresztül. Ilyen zsírsav lehet a mirisztinsav (tetradekánsav, 14:00) és a laurinsav (dodekánsav, 12:00), vagy ezeknek a hidroxilált származékai, mint például a cisz-11-oktadekánsav (*Rhodospirillum salinarum*), a 3-hidroxi-5-dodekánsav (*Phenylobacterium immobilis*) és az izo-2,3-dihidroxitetradekánsav (*Legionella pneumophila*). Az A-lipid az endotoxinok állandó alkotórészeként szerkezeti különbségekkel is rendelkezik a fajok és a törzsek között. Így az A-lipid felépítésében különböző típusú amino-cukrok is részt vehetnek. Ugyanakkor az A-lipid diszacharid részéhez kapcsolódó zsírsavakat, foszfát-csoportokat és/vagy az etanol-amint is különböző vegyületek, csoportok helyettesíthetők. Az A-lipidet felépítő zsírsavak típusát, mennyiségét és eloszlását illetően is vannak eltérések. Egyes baktériumok esetében az A-lipid szacharid gerincét a glükózamintól eltérő cukrok is alkothatják, mint például a 2,3-diamino-2,3-dideoxi-D-glükóz. Ezekhez a cukor részekhez nemcsak foszfát-csoportok és etanol-amin kapcsolódhat, hanem β -mannopiranoz, 4-aminoarabinóz, galakturonsav és a glicin. Az A-lipid az endotoxin konzervatív része, amely felelős a LPS molekula biológiai aktivitásáért. A lipopoliszacharidot a Gram-negatív baktériumok szinte levedlik, melyek ezt követően már kit tudják fejteni a hatásukat a TLR4 receptorra, és kiváltják a gyulladást. (69, 70).

A makrofágok aktivációja

A makrofágok általános jellemzői

A szervezetbe jutó LPS vegyülettel kezdetben a természetes immunrendszer sejtjei közé tartozó monociták, makrofágok találkoznak. A természetes immunrendszer sejtjei (monociták, makrofágok, dendritikus sejtek, természetes ölü sejtek) a kültakaró után a szervezet elsődleges védelmi vonalát alkotják a kórokozókkal és a károsító behatásokkal szemben. A monociták 10-15 μm átmérőjű, bab alakú sejttaggal rendelkező sejtek, melyek jelentős számú falósejt vakuolummal és dús citoszkeletális hálózattal rendelkeznek. A monociták a promonocitákból alakulnak ki a vérben. A promonociták pedig a csontvelő mielőid progenitor sejtekből differenciálódnak citokinek (GM-CSF, M-CSF, IL-3) hatására. A monociták megnagyobbodott szöveti lokalizált formái a makrofágok, melyek minden szervben és kötőszövetben előfordulnak, és elnevezésük ennek megfelelően eltérő lehet. A mikroglia sejtek a központi idegrendszer, a Kupffer sejtek a máj, az alveoláris makrofágok a tüdő makrofágjai. A monocita, makrofág sejtek a nem fajlagos (természetes) immunválasz részeseiként központi szerepet játszanak a fajlagos (adaptív) immunválasz kialakításában. Fő feladatuk a fagocitózis és egyes biológiailag aktív molekulák (pl. citokinek, növekedési faktorok, kemokinek, komplement fehérjék, kostimulátorok) bioszintézise. Jelentős szerepük van az antigén bemutatásban és a sejtközvetített immunválaszban, mint effektor sejtek (71).

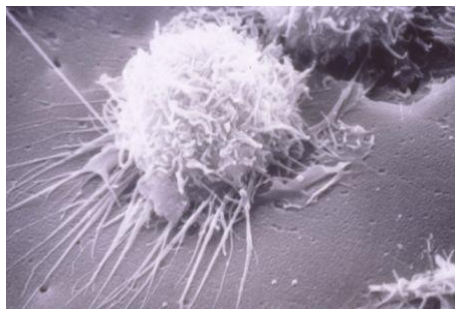
A makrofágok aktivációjának típusai

A makrofágoknak az M1 és M2 típusú aktivációját különböztetjük meg. Az M1 típusú makrofágok közé tartoznak a klasszikusan aktiválódott makrofágok, melyek proinflammatorikus citokin termelésükkel kiváltják a gyulladást, és hozzájárulnak a szövetek

és az extracelluláris mátrix károsodásához (72). Az M2 típusú makrofágok részt vesznek az extracelluláris mátrix felépítésében, és a megnövekedett antiinflammatorikus citokin termelésüknek köszönhetően csökkentik a gyulladást (72-74). A szepszis immunszuppresszáns szakaszában megjelennek olyan makrofágok, melyek az LPS kezelés hatására szinte alig termelnek proinflammatorikus citokineket, emellett nem váltják ki a $CD4^+$ Th1 T-sejtek osztódását, aktivációját és az IFN gamma termelését, melyek a makrofágok klasszikus aktivációját, és citokin termelését fokozzák (75).

A klasszikusan aktiválódott M1 típusú makrofágok

A klasszikus aktivációhoz önmagában is elegendő a Gram-negatív baktériumok lipopoliszacharidja (LPS). Az LPS indukálta sejtek citokin termelését azonban tovább fokozza $IFN\gamma$ receptorhoz kapcsolódó interferon γ ($IFN\gamma$) (76, 77). Az $IFN\gamma$ egymaga azonban nem biztosítja a makrofágok aktivációját (78). A makrofágok alakja és szekréciója jelentősen megváltozik az aktiválást követően (6. ábra). Az aktivált makrofágok térfogata megnövekszik, valamint nagy mennyiségben termelnek proinflammatorikus ($IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $IL-12$) citokineket, kemokineket, reaktív oxigén (ROS) és nitrogén fajtákat (NO). Emellett szinte elhanyagolható mennyiségben szekretálnak antiinflammatorikus, $IL-10$ citokint (79-82). A Gram-negatív baktériumok és komponenseinek a felvétele fagocitózissal (83) történik a sejt lizoszómáiban, ahol számos enzim (katepszin) vesz részt a feldolgozásában (84). A patogének és toxinjaik feldolgozása során kapott antigéneket a makrofágok az MHCII sejt felszíni receptoraik segítségével prezentálják legfőképpen a $CD4^+$ Th1 sejteknek (85), a B7 családba tartozó kostimulátoraik ($CD86$) segítségével. A makrofágok az antigén prezentáció mellett, az $IL-12$ szekréciójukkal kiváltják a $CD4^+$ Th1 sejtek aktivációját (86). A Th1 sejtek ezt követően különböző citokineket ($IFN\gamma$, $IL-12$, $IL-2$ és $TNF\beta$) szekretálnak (81, 87), melyek közül az $IFN\gamma$ a makrofágok aktivációját, citokin termelését tovább fokozza. A makrofágok által szekretált kemokinek a sérülés helyére vonzzák a Th1 típusú sejt immunválaszban részt vevő a kórokozók, patogén eltávolításért felelős effektor sejteket (neutrofil granulocitákat, az éretlen dendritikus sejteket, a természetes ölü sejteket, és az aktivált $CD8^+$ citotoxikus T sejteket). (71, 82). A klasszikusan aktivált makrofágok proteolitikus enzimeket is szekretálnak, melyek az extracelluláris mátrixot felépítő kollagén, fibronectin és elasztin lebontását végzik (88-90).



6. ábra Az aktivált makrofág. A makrofágoknak az aktivációja során a megnövekszik a térfogata, miközben nyúlványokat növesztenek.

Az IgG komplex aktiválta M2 típusú makrofágok

A makrofágok M2 típusú aktivációjáért számos stimulus tehető felelőssé. Közéjük tartozik az IgG komplex, $IL4$ vagy a glükokortikoidok. Az IgG komplex megjelenését kismértékben kiváltják a klasszikusan aktivált makrofágok is, valamint az LPS önmagában is a B-limfociták TLR4 receptorához kapcsolódva (91, 92). Az IgG komplex az LPS és az $IFN-\gamma$ aktivált makrofágok $Fc\gamma$ receptoraihoz ($Fc\gamma R$) kapcsolódik, és szinte teljesen lecsökkenti a makrofágok $IL-12$ szekrécióját, miközben az antiinflammatorikus $IL-10$ termelésüket

szignifikánsan megnöveli (79-81). Ezek a makrofágok ezt követően már a CD4⁺ Th2 T-limfocitáknak prezentálják az antigént. A CD4⁺ Th2 T-sejtek a makrofágok IL-10 szekréciójának is köszönhetően aktiválódnak, és rájuk jellemző citokineket termelnek (IL-4, IL-10, IL-5, IL-6, IL-13). Ezen citokinek közül az IL-4 a plazmasejtek IgG termelését váltja ki, miközben a Th1 sejtek IFN γ szekrécióját gátolja (71, 93). Az IgG komplex aktiválta makrofágok és a Th2 sejtek által termelt IL-10 pedig lecsökkenti a makrofágok proinflammatorikus citokin szekrécióját és korlátozza az antigén prezentációjukat, az MHCII sejtfelszíni molekulák és a B7 kostimulátorok mennyiségének a csökkentésével (94-97).

A C57BL/6 egerekben az LPS hatására a makrofágok klasszikus aktivációjáról és a Th1 típusú sejt immunválaszról beszélünk. Ugyanakkor az egerekben az LPS hatására a klasszikusan aktivált makrofágok jóval nagyobb mennyiségben vannak jelen, mint az IgG komplex aktiválta makrofágok. Ez egyrészt abból adódik, hogy az LPS kismértékben váltja ki a plazmasejtek IgG termelését, a B sejtek TLR4 receptorához kapcsolódva, másrészt abból is, hogy a klasszikusan aktivált makrofágok is csak kis mértékben váltják ki a plazmasejtek IgG termelését. Ezt igazolják azok a publikációk is, melyek arról számolnak be, hogy a Gram-negatív baktériumok lipopoliszacharidja a C57BL/6 egerekben főként a makrofágok klasszikus aktivációjáért és a sejt immunválasz kialakításáért felelős (71, 98, 79-81).

Az IL-4 aktiválta M2 típusú makrofágok

A szepszis hiperinflammatorikus, gyógyuló szakaszában megjelenhetnek olyan makrofágok, melyek aktivációjáért az IL-4 vagy glükokortikoidok felelősek. Természetesen itt már nincsen jelen az LPS. Az IL-4 és glükokortikoiddal aktivált makrofágok nem termelnek az oxidatív stresszhez hozzájáruló nitrogén monoxid gyököt (99) valamint a gyulladás csökkentésében részt vevő IL-10-et, miközben IL-1 receptor antagonistát szekretálnak. Emellett gátolják a CD4⁺ T-limfociták osztódását és citokin termelését (100), melyek az adaptív immunválasz irányát határozzák meg. Emellett részt vesznek az extracelluláris mátrix felépítésében, mivel a mátrixot felépítő fibronectint, és mátrixhoz kapcsolódó fehérjéket termelnek (β IG-H3) (101-103).

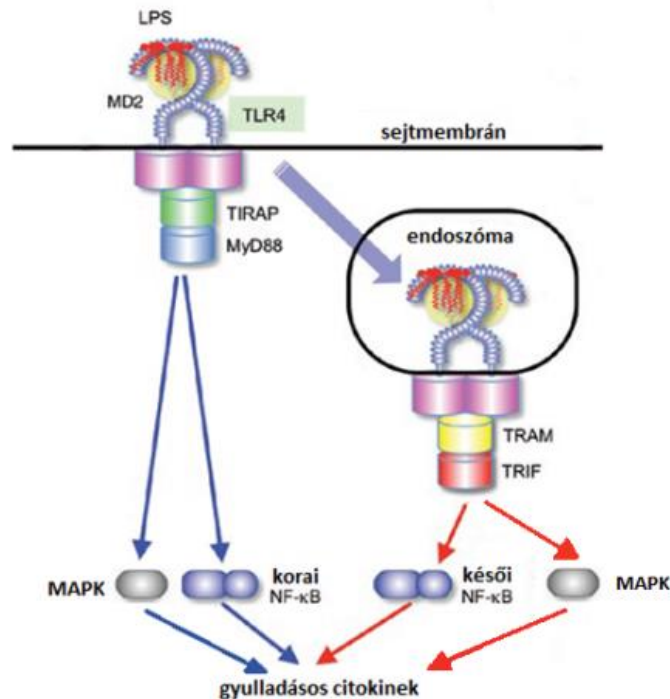
Az LPS inszenzitív makrofágok

LPS inszenzitív makrofágok, a szepszis hipoinflammatorikus szakaszában jelennek meg, abban az esetben, amikor az eltűnt gyulladás nem követi gyógyulást. Ezeknek a makrofágoknak az LPS érzékenysége jelentősen lecsökken, mivel az LPS kezelés hatására szinte alig szekretálnak proinflammatorikus citokineket (TNF- α , IL-1 β). Valamint nem váltják ki a CD4⁺T-sejtek osztódását, aktivációját és IFN gamma termelését, azaz Th1 típusú adaptív immunválaszt (75).

A klasszikusan aktiválódott makrofágok jelátvitel

A szervezetbe jutó LPS a véráramban kapcsolódik az oldott állapotban lévő LPS kötő fehérjéhez (LPS binding protein, LBP). Az LBP/LPS komplex ezt követően kapcsolódik a plazmamembrán glikozilfoszfatidilinozitoljához kihorgonyozott CD14 receptorhoz (104). A CD14 elősegíti LPS átvitelét a TLR4/MD-2 komplexre (105, 106). A TLR4 receptor az LPS kapcsolódását követően oligomerizálódik, és Toll-interleukin-1 (TIR) intracelluláris alegységéhez TIR alegységet tartalmazó fehérjék kapcsolódnak (MYD88, TIRAP, TRIF, TRAM). Így a TLR4 jelátvitelében elkülönítjük a MyD88-függő és a MyD88-független (TRIF-függő) útvonalat. A MyD88-függő útvonalon történik az NF- κ B korai és MAP kinázok aktivációja, aminek köszönhetően megindul a gyulladásos citokinek expressziója. A MyD88-független útvonal az NF- κ B késői valamint a MAPK tagjainak aktivációjáért, a gyulladásos

citokinek expressziójáért és az I-es típusú interferonok termeléséért felelős (107) (7. ábra). A TLR4 receptorhoz kapcsolódó MyD88-függő és MyD88-független útvonalat, az útvonal számos pontján több gátló faktor is szabályozza. Valószínűleg ezeknek a faktoroknak a felerősödött hatásának köszönhető az LPS inszenzitív makrofágok megjelenése az immungyenge szakaszban (108).

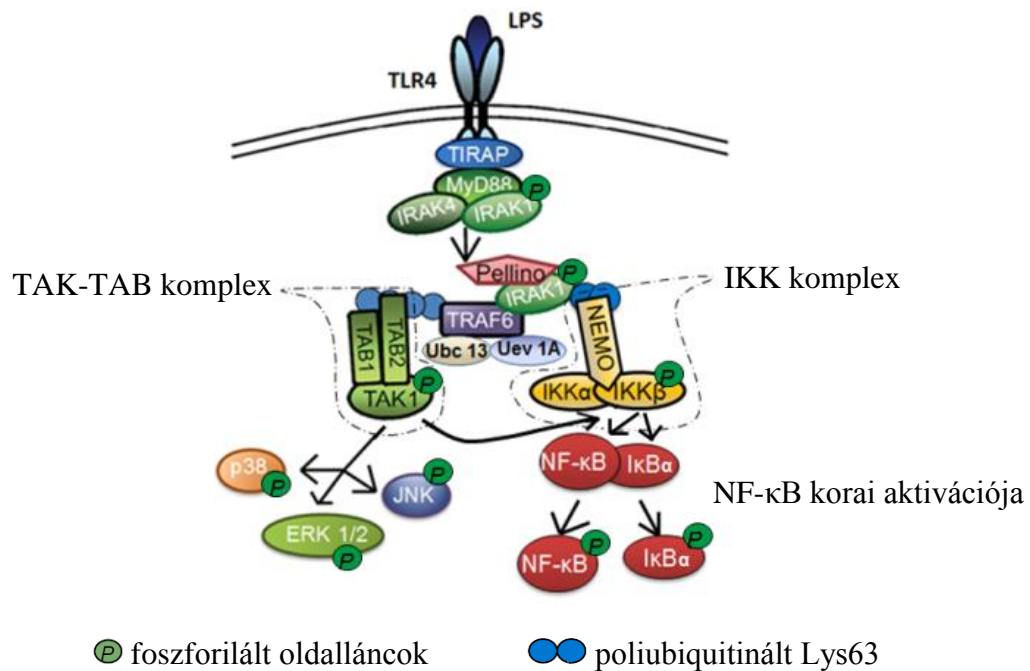


7. ábra A MyD88-függő és a MyD88-független útvonal. A MyD88-függő útvonal felelős az NF-κB korai valamint a MAPK tagjainak aktivációjáért, és a gyulladásos citokinek expressziójáért. A MyD88-független útvonal, pedig az NF-κB késői aktivációjáért, a MAPK tagjainak aktivációjáért, a gyulladásos citokinek expressziójáért valamint az I-es típusú interferonok termeléséért felelős.

A MyD88-függő útvonal

A TLR4 TIR alegységéhez először TIRAP fehérje, majd később a MyD88 fehérje a TIR alegységén keresztül kapcsolódik (8. ábra). A MyD88 halál alegységéhez az IL-1 receptor-asszociált kinázok 4 (IRAK4) kapcsolódik. Majd a TIRAP/MyD88/IRAK4 komplexhez kapcsolódik az IL-1 receptor-asszociált kináz 1 (IRAK1). Az IRAK4 kináz ezt követően foszforilálja, és így aktiválja az IRAK1 kinázt, ami ezt követően leválik a komplexről és kapcsolódik a TRAF6 fehérjéhez, és aktiválja azt. Az IRAK1 és IRAK4 közben foszforilálja a Pellino (E3 ubiquitin ligáz) fehérjét is, mely a TRAF6 fehérjéhez kapcsolódik, és a TRAF6 fehérjét ubiquitinálja. A TRAF6 poliubiquitinálja a hozzá kapcsolódó IRAK1 és saját 63-as helyzetű lizinjeit (K63). Ezt követően a TRAF6/IRAK1/Pellino komplexhez kapcsolódik a TAK-TAB komplex (TAK1, TAB1, TAB2) a TAB1 és TAB2 szabályozó elemek ubiquitin kötő alegységén keresztül. Emellett a TRAF6/IRAK1/Pellino komplexhez kapcsolódik még az IKK komplex (IKK α , IKK β , NEMO) is a NEMO (IKK γ) szabályozó alegységén található ubiquitin kötő alegységén keresztül. Az IKK komplexben az IKK α és β rendelkezik kináz aktivitással. Emellett a TRAF 6 fehérjéhez az Ubc13 és Uev1A enzimek is kapcsolódnak. A TAK-TAB komplex kapcsolódását követően a TAK1 aktiválódik és foszforilálja az IKK komplex IKK β alegységét, ami foszforilálja a citoplazmában az NF-κB transzkripciós faktort és a hozzá kapcsolódó az I κ B α gátló alegységet is. Az I κ B gátló alegység a foszforilációja után leválik, ubiquitinálódik és a proteozómákban degradálódik. Az NF-κB ezt követően a sejtmagba helyeződik át, és a génexpressziót szabályozza (108, 109, 112). A MyD88 útvonal

az NF- κ B korai aktivációját biztosítja. A MyD88 útvonalon a TAK1 foszforilálja és aktiválja a MAPK (mitogen activated protein kinase) kaskád tagjait (ERK1, ERK2, JNK, p38) (108, 109).



8. ábra A MyD88-függő útvonal. A TLR 4 receptorhoz kapcsolódó LPS kiváltja a TIRAP, MyD88 az IRAK4 és az IRAK1 kapcsolódását. Az IRAK1 ezt követően foszforilálódik, majd leválik és komplexet alkot a TAB-TAK (TAK1, TAB1/2) és IKK (NEMO, IKK α , IKK β) komplexekkel és Pellino fehérjével. A TRAF 6 fehérjéhez kapcsolódik még az Ubc 13 és Uev 1A enzim is. A TAK1 foszforilálja a MAPK tagjait (ERK1/2, JNK, p38), valamint az IKK komplexet felépítő IKK β kinázt. Az IKK β pedig foszforilálja az NF- κ B (p50/p65) transzkripciós faktort és a transzkripciós faktorhoz kapcsolódó I κ B α gátló alegységet.

A MyD88-független, TRIF-függő útvonal

A TLR4/MD2/LPS komplex a későbbiekben dinamin-függő endocitózissal endoszómákba kerül, ahol a TLR4 a TRIF és a TRAM fehérjékkel komplexet alkot (7. ábra). A TRIF ezt követően toborozza a TRAF6 fehérjét, amelyhez kapcsolódik az IKK és a TAB-TAK komplex is, így aktiválódik az NF- κ B transzkripciós faktort és a MAP kinázok is. A MyD88-független útvonalon az NF- κ B késői aktivációja történik. A TRIF fehérjéhez (a RIP1 homotipikus interakciós alegységén keresztül) kapcsolódik még a RIP1, a TRADD és a Pellino-1 fehérje is. A RIP1 kapcsolódását követően a 63. helyzetű lizin aminosaván ubiquitinálódik. Ez utóbbi folyamat ugyanakkor a már létező NF- κ B aktivációját és a TRADD fehérje jelenlétét igényli. Ezt követően TRIF/RIP1/TRADD/Pellino1 komplex szintén aktiválja a TAK-TAB komplexben lévő TAK1 kinázt, ami a MyD88 függő útvonalhoz hasonlóan foszforilálja az IKK komplex IKK β alegységét, így aktiválja az NF- κ B transzkripciós faktort. Valamint a TAK1 ezen az útvonalon is aktiválja a MAP kinázokat (108). A MyD88-függő útvonal sokkal korábban aktiválódik, mint a TRIF-függő útvonal, de mindkét útvonal szükséges az NF- κ B kanonikus és a MAP kinázok (ERK, JNK, p38) aktivációjához és gyulladást kiváltó citokinek expressziójához (108).

Az NF- κ B transzkripciós faktor

Az NF- κ B transzkripciós faktor a MyD88-függő és MyD88-független útvonalon egyaránt aktiválódik (106). A MyD88-függő útvonal esetében a korai a MyD88-független útvonal

esetében az NF- κ B késői kanonikus aktivációjáról beszélünk (109) (6. ábra). Az NF- κ B dimer szerkezetű. A dimerek felépítésében a Rel család tagjai (p50, p52, p65, c-Rel, RelB) vesznek részt, melyek mind rendelkeznek Rel homológ alegységgel (Rel homology domain, RHD), amin keresztül kapcsolódva homodimereket vagy heterodimereket hoznak létre (109, 110). A klasszikus p50/p65 heterodimerekből álló NF- κ B transzkripciós faktor a citoszolban az I κ B α gátló alegységhez kapcsolódik. Az I κ B α alegységet a foszforilált IKK β kináz foszforilálja (108). A foszforiláció után az I κ B leválik a dimerekről, ubiquitinálódik és a proteasomákban degradálódik (7. ábra) (108). Ezt követően maguk az NF- κ B dimerek is foszforilálódnak. Az NF- κ B p65 alegység az NF- κ B család legnagyobb transzkripciós aktivitással rendelkező tagja, mely 12 helyen foszforilálódhat (111). A foszforiláció helye meghatározza, hogy a p65 alegység, milyen a gének átírását gátló vagy serkentő kofaktorokkal működhet együtt (111). Az NF- κ B p65 Ser536 aminosavát szintén a foszforilált IKK β foszforilálja (112), ez a foszforiláció pedig a TNF- α , IL-1 β és az IL-6 transzkripcióját biztosítja (111). Az NF- κ B p65 aktivációjához szükség van a foszforilációja mellett az acetilációjára is. Az NF- κ B a megfelelő gén szekvenciákhoz, promoter/enhancer elemekhez való kapcsolódását meghatározza az újonnan szintetizált, sejtmagba transzlokálódó I κ B α mennyisége is, amely újra kapcsolódhat a transzkripciós faktor p65 alegységéhez, gátolva kötődését a DNS-hez (110). Ezt a folyamatot azonban a magban lévő I κ B kináz tudja gátolni az I κ B foszforilációjával (113). A sejtmagba transzlokálódott és a DNS megfelelő eleméhez kapcsolódó p50/p50 homodimerekből valamint a klasszikus p50/p65 heterodimerekből álló NF- κ B transzkripciós faktor a gyulladás kialakító gének átírásáért felelős (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , iNOS, COX-2) (108, 112, 110, 114).

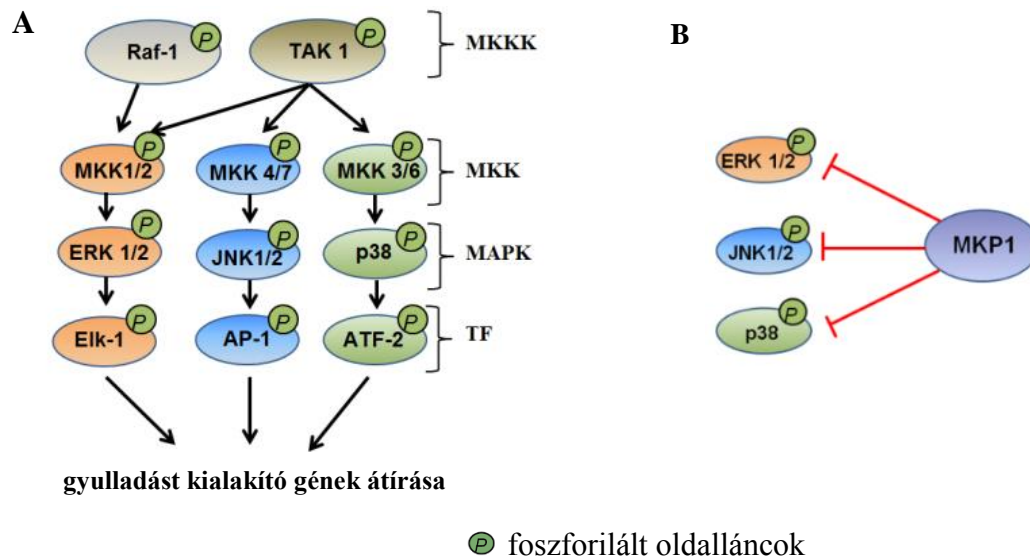
A MAP kinázok

A MyD88-függő és MyD88-független útvonalon egyaránt aktiválódnak a MAP (szerin/treonin) kinázok: az ERK1/2, a JNK1/2 és a p38. A p38 MAP kináz 4 (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ), a JNK kináz három (JNK1-3) az ERK kináz 8 (ERK1-8) izoformával rendelkezik. Az ERK1 és ERK2, valamint a JNK1-3 és a p38 izoformák mind az LPS indukció hatására a gyulladás kialakításában vesznek részt (115, 116). Ezeket a kinázokat a jelátvitelben feljebb lévő MKK kinázok aktiválják foszforilációval. Az MKK fehérjéket pedig MKKK kinázok foszforilálják, aktiválják. Az MKK kinázok közé tartozik a TAK1 és Raf1 (108, 117, 118=112). A foszforilált (Ser³³⁸, Tyr³⁴¹) és aktív Raf1 az ERK1/2 kinázt aktiválja (pl.: Raf1 \rightarrow MKK1/2 \rightarrow ERK1/2) (117). A MAPK fehérjék aktivációját a makrofágokban a mikroorganizmusok eliminálását biztosító oxidatív stressz is kiváltja (118). A MAP kinázok a jelátvitel végén álló transzkripciós faktorokat foszforilációval aktiválják (pl.: Elk-1/CREB, AP-1, ATF-2). A transzkripciós faktorok pedig a sejtmagban kiváltják a gyulladást kialakító gének expresszióját (TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS) (115, 116, 119, 120) (8. ábra). Ugyanakkor MAP kinázok részt vesznek az NF- κ B transzkripciós faktor aktivációjában is (121).

Az MKP1 foszfatáz

Az LPS indukálta jelátvitel során a MAP kináz foszfatázok (MKP) mennyisége jelentősen megnövekszik. A MAP kináz foszfatázok a kettős specifitású foszfatázok családjába tartoznak, mivel szerin vagy treonin és tirozin oldalláncokon lévő foszfát csoportokat távolítják el. A MAP kináz foszfatázoknak 10 izoformáját (MKP1-10) különíthetjük el, melyek között az MKP1 az immunfolyamatok gátlásáért, a MAP kinázok, az ERK1/2, a JNK1/2 és a p38 defoszforilációjáért, inaktivációjáért felelős (122). Az MKP1 aktivitását meghatározza az is, hogy exogén stressz milyen mértékben indukálja vagy gátolja a foszfatáz génextpresszióját, és az is, hogy a fehérje milyen poszttranszkripcionális, poszttranszlációs változásokon megy keresztül. Például, ha az ERK foszforilálja az MKP1-et, akkor a

foszfátáznak a félelet ideje jelentősen megnövekszik, mivel a foszforilációja gátolja az ubiquitin függő degradációját (123) (9. ábra).

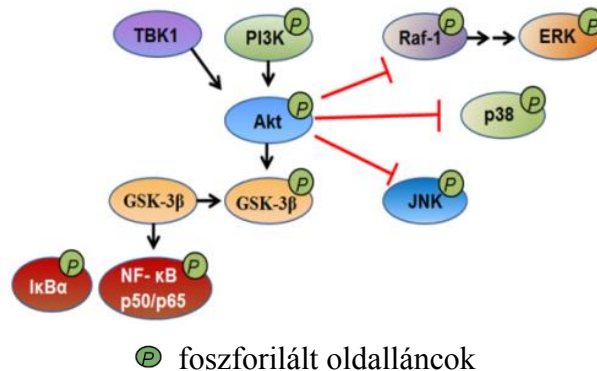


9. ábra A makrofágokban az LPS stimulusra aktiválódó MAPK kaszkád tagjai. A MAPK kaszkád tagjai egymást foszforilációval aktiválják, így az MKKK (TAK1, RAF-1) fehérjék foszforilálják az MKK kinázokat (MKK1/2, MKK4/7, MKK3/6), ez utóbbiak pedig a MAP kinázokat (ERK 1/2, JNK 1/2, p38) (A). A MAPK tagjai végül a megfelelő transzkripciós faktorokon (TF) (Egr1, AP-1, ATF-2) keresztül kiváltják a gyulladás kialakításában részt velő gének expresszióját (pl.: TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS) (A). Az MKP1 (MAP kináz foszfatáz) a MAPK tagjait (ERK 1/2, JNK 1/2, p38) defoszforilációval inaktíválja, így gátolja az LPS indukálta gyulladást (B).

Az Akt

Az Akt fehérjecsaldába három szerin/treonin protein kináz tartozik (Akt1, Akt2, Akt3), melyek különböző aminosavak foszforilációjával aktiválódnak. Az Akt1 a Thr450, a Thr308, a Ser473 az Akt2 a Thr309, a Ser474 és az Akt3 a Thr305, a Ser472 aminosavakon foszforilálódik. Mind a három izoforma megtalálható a makrofágokban. Az Akt1 az LPS hatására a MyD88-függő PI3K/Akt (124), valamint a MyD88-független TRAM/TRIF útvonalon egyaránt aktiválódik (10. ábra). A MyD88-független útvonalon a TRAM/TRIF komplexhez kapcsolódó TBK1 (TRIF/TANK-binding kinase 1) foszforilálja az Akt1 fehérjét (125). A makrofágokban a PI3K/Akt útvonalon az Akt1 aktivációjában a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) család IA osztálya vesz részt (126, 127). Az aktív, foszforilált IA PI3K foszforilálja a membrán foszfatidilinozitol-3,4-biszfoszfátjait (PIP2), miközben foszfatidilinozitol-3,4,5-triszfoszfát (PIP3) keletkezik, amely felhalmozódik a membránban. A sejtmembránban a PIP3 molekulákhoz a protein kináz B (Akt) kapcsolódik a PH alegységén keresztül valamint a PDK1 (foszfatidilinozitol-függő kináz 1). Az Akt1 három aminosavának (Thr450, Thr308, Ser473) együttes foszforilációja szükséges az Akt1 teljes aktivációjához. Először a JNK foszforilálja a Thr450 aminosavat, ezt követően a PDK1 foszforilálja a Thr308 oldalláncot, végül a Ser473 oldalláncot foszforilálják különböző kinázok (PDK2, mTORC2, DNA-PK) (128, 129). A PI3K/Akt útvonalat az irodalom a sejtek túlélését, növekedését, osztódását biztosító útvonalként említi (126). Az LPS stimulus hatására aktiválódó PI3K/Akt útvonal a gyulladás csökkentésén keresztül biztosítja a sejtek túlélését. A PI3K/Akt útvonal a gyulladás csökkentő hatását a RAF-1/ERK, JNK1/2, p38 útvonalak valamint az NF- κ B (p50/p65) aktivációjának gátlásán keresztül feje ki (130, 120, 114). Az NF- κ B (p50/p65) transzkripciós faktor gátlását a GSK-3 β szerin/treonin kináz inaktíválásán keresztül éri el. Az Akt1 a GSK-3 β N-terminálisán lévő Ser9-et foszforilálja, és így a GSK-3 β inaktív állapotba

kerül (130, 120, 114), mely ezt követően nem tudja foszforilálni, aktiválni a gyulladást kialakító NF- κ B p65 transzkripciós faktort (114, 130, 131).



10. ábra Az Akt. Az Akt fehérje a MyD88-függő, PI3K/Akt és a MyD88-független, TBK1/Akt útvonalon egyaránt aktiválódik az LPS hatására. Az Akt a gyulladást gátló hatását a RAF1/ERK, JNK1/2, p38 útvonalak valamint az NF- κ B (p65/p50) aktivációjának gátlásán keresztül feje ki.

A FoxO transzkripciós faktorok

A Forkhead családba tartozó FoxO (Forkhead box O) transzkripciós faktorok a sejtek osztódását, differenciálódását és túlélését szabályozzák (132). A FoxO transzkripciós faktorok az oxidatív stressz káros hatásaival szemben védik a sejteket, mivel a DNS károsodásokat javító fehérjéket, valamint az oxidatív stressz csökkentésében elengedhetetlen enzimeket (pl.: MnSOD, kataláz, peroxiredoxin III) kódoló gének átírásáért felelősek (130). Abban az esetben, ha az oxidatív stressz tartósan magas, a FoxO-3a hozzájárul az apoptózishoz, azáltal hogy kiváltja proapoptotikus gének expresszióját (132, 133). A FoxO fehérjék aktivációja és inaktivációja is különböző szerin és treonin aminosavainak foszforilációját igényli. A FoxO transzkripciós faktorok aktivációjához így elengedhetetlen a FoxO fehérjéket inaktíváló PI3K/Akt útvonal aktivációjának csökkenése. Az aktivált Akt foszforilálja a jelátvitelben utána következő FoxO1 transzkripciós faktort a Thr24, Ser256, Ser319 aminosavakon, a FoxO-3a transzkripciós faktort a Thr32, Ser256 és Ser319 aminosavakon, valamint a FoxO4 transzkripciós faktort a Thr32 és Ser197 aminosavakon (132). Ezeknek a foszforilációknak a hatására a FoxO fehérjék allosztérikus szerkezetátalakuláson mennek keresztül, így a citoplazmában a 14-3-3 fehérje család tagjai hozzájuk kapcsolódnak, és eltakarják a fehérjék, nukleális lokalizációs szignálját. Evvel megakadályozzák a transzkripciós faktorok DNS-hez való kötődését (132, 133). Emellett megjelennek másodlagos kötőhelyek az exportinok számára (Crm1, Ran), melyek a FoxO fehérjék DNS-ről való leválásáért és citoplazmába való transzportjáért felelősek (132).

A mitokondrium

A makrofágokon és a tüdő sejtjein belüli jelátviteli folyamatok hatással vannak a mitokondrium külső és belső porúsának nyílására, a mitokondrium reaktív oxigén fajtáinak (ROS) és az ATP termelésére, a mitokondrium feldarabolódására valamint a sejt mitokondrium által szabályozott halálára.

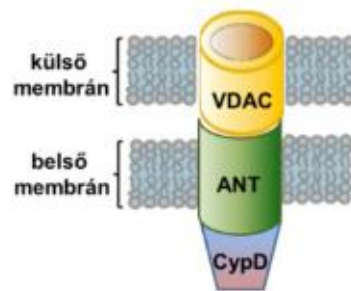
A mitokondrium általános jellemzői

A mitokondrium feladatai közé tartozik a sejt biokémiai folyamataihoz szükséges ATP szintézise, a sejt Ca^{2+} homeosztázisának és az apoptózisnak a szabályozása, valamint a

patogének eliminálásához elengedhetetlen oxidatív stressz kialakítása. A mitokondriumot két membrán határolja. A két membránon belül található a mitokondrium mátrixa. A mátrixában játszódik le a citromsav ciklus és egyéb biokémiai folyamatok. A mátrixban található még egyéb ionok (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+), anorganikus foszfát (Pi), az ADP, az ATP és oldott intermedierek. A külső membrán kisebb molekulák és ionok számára átjárható, míg a belső membrán átjárhatatlan a legtöbb molekulára és ionra, különösen a H^+ -ionokra. A belső membránban találhatóak a légzési elektrontranszport lánc komplexei (komplex I-IV) valamint az F_0F_1 ATP szintáz.

A klasszikus mitokondriális pórus felépítése

A membrán átjárhatóságát növeli a külső és belső mitokondriális membránon átívelő pórus, az mPTP. Az mPTP a külső membránban (OMP) és a belső membránban lévő pórusokból áll (IMP). Az mPTP megjelenését az oxidatív stressz, a mátrixban a Ca^{2+} ionok felhalmozódása, valamint az LPS is kiváltja. A klasszikus értelemben vett mPTP-t a külső membránban a feszültség függő anion csatorna (VDAC), a belső membránban az ATP/ADP transzlokátor (ANT) valamint a mátrixban a ciklofilin D (CypD) alkotja (11. ábra). A pórus működését a citoszolban található hexokináz, az antiapoptotikus Bcl-2 és Bcl-xL és az intermembrán térben lévő kreatin kináz, valamint a (145) a külső membránban lévő benzodiazepin receptor szabályozza (134). Az irodalomban azt is olvashatjuk, hogy az ANT és a VDAC hiányában is kialakul az mPTP (135, 136).



11. ábra A klasszikus mPTP felépítése. A hagyományos értelemben vett mitokondriális pórust (mPTP) a külső membránban a VDAC fehérje, a belső membránban az ANT és a mitokondrium mátrixában található CypD alkotja.

A CypD

A CypD a teljes pórusnyílás elengedhetetlen szabályozója. A fehérjét a sejtmagban található Ppif gén kódolja és a mitokondrium mátrixába jutását a fehérje N-terminálisán lévő célszekvencia biztosítja, mely a mitokondriumba lépést követően leválik. A CypD valószínűleg a mitokondrium belső membránjában lévő lépő fehérjék (ANT, PiC, F_0F_1 ATP szintáz dimerek) peptidil-prolil kötéseinek cisz-transz izomerizációján keresztül váltja ki a fehérjék pórus formálódását. Ugyanakkor a CypD a belső pórusnyíláson keresztül szabályozza a mitokondrium depolarizációját, a reaktív oxigén fajták termelését, a mitokondrium fragmentációját, valamint a mitokondrium külső membránjában lévő pórusok nyílásához kötött apoptózist is (137; 138).

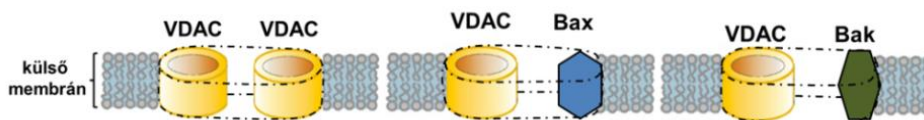
A külső mitokondriális membránban lévő pórusok

A VDAC homooligimerek, valamint a VDAC és a Bax vagy a Bak heterooligomerek

A VDAC fehérjének az egerekben 3 izoformája van (VDAC1-3), melyek molekulatömege egyaránt 30kDa (139). A mitokondrium külső membránjában a VDAC1 és a VDAC2 külön csoportokban, míg a VDAC3 elszórtan helyezkedik el. Ugyanakkor a VDAC2 jóval kisebb

számban van jelen, mint a VDAC1 (140). Mindhárom izoformára egyaránt jellemző, hogy a külső membránban egy olyan gyengén ionszelektív csatornát nyit, mely nyitott állapotban maximum 5 kDa (pl.: ATP, ADP, P_i, légzési lánc szubsztrátjai, kreatin foszfát) nagyságú főként anionok számára átjárható. Zárt állapotában pedig maximum 1,5 kDa (pl.: Ca²⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻) nagyságú inkább kationok számára átjárható (139, 141, 142). A VDAC csatornák csak nyitott állapotukban biztosítják a mitokondrium és a sejt metabolikus folyamataihoz szükséges anyagok kétirányú mozgását (139=150). Azonban mind a pozitív mind a negatív irányba történő membránpotenciál változás a csatorna záródásához és a sejtlégzés megszűnéséhez vezet (141). Itt meg kell említeni, hogy csak a VDAC1 és a VDAC2 ioncsatorna záródása feszültségfüggő (143).

A VDAC1 fehérjék részt vesznek az apoptózis szabályozásában is (144). Ebben az esetben a VDAC1 dimerek már egy akkora pórust nyitnak a külső membránban, amely lehetővé teszi az intermembrán térben lévő a proapoptotikus (Cyt-C, Smac/Diablo, HtrA2/Omi, AIF, ENDO-G) faktorok kiszabadulását és az apoptózist (145, 146). A VDAC1 fehérjék a proapoptotikus Bax és Bak fehérjékhez is kapcsolódhatnak, miközben heterodimereket alkotnak, melyek a külső membránban szintén megfelelő nagyságú pórusokat nyitnak az apoptózishoz (147, 148). Az antiapoptotikus faktorok (Bcl-2, Bcl-xL) a VDAC1 monomerekhez és dimerekhez kapcsolódnak, és gátolják a külső pórusok nyílását. (145, 146, 148). Ugyanakkor, ha az antiapoptotikus Bcl-xL és a hexokináz a monomer VDAC fehérjékhez kapcsolódik, abban az esetben kiváltja a VDAC monomerek nyílását, és a metabolikus folyamatokhoz szükséges anyagok transzportját (149, 150) (12. ábra).

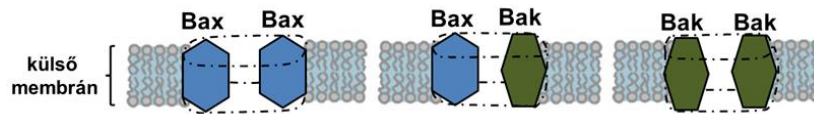


12. ábra A VDAC homooligomerek, valamint a VDAC és a BAX vagy a BAK hetreooligomerek, mint külső pórusok. A külső membránban elhelyezkedő VDAC fehérjék nemcsak monomer, hanem oligomer (homodimer, homotrimer, homotetramer) szerkezetben is előfordulnak. Ugyanakkor VDAC ezen alakjai folyamatosan egymásba alakulnak. A VDAC fehérjék azonban a proapoptotikus BAX és BAK fehérjékhez is kapcsolódhatnak, miközben heterodimereket hoznak létre. A VDAC homo- és hetreooligomerek pórust nyitnak a mitokondrium külső membránjában, lehetővé téve az intermembrán térben lévő proapoptotikus faktorok (Cyt-C, Smac/Diablo, HtrA2/Omi, AIF, ENDO-G) kiszabadulását, és a makrofágok apoptózisát.

A Bax és Bak homodimerek, homotrimerek vagy heterodimerek

A külső membránban a Bax és Bak proapoptotikus faktorok homodimereket, homotrimereket, heterodimereket alkotnak, melyek szintén egy akkora pórust nyitnak, melyek lehetővé teszik az intermembrán térben lévő proapoptotikus faktorok kiszabadulását (Cyt-C, Smac/Diablo, HtrA2/Omi, AIF, ENDO-G), és az apoptózist (151). Normál körülmények között a Bax monomerek a citoszolban a Ku70 faktorhoz kapcsolódnak, míg a Bak monomerek a mitokondrium külső membránjában találhatóak és főként a VDAC2 fehérjékhez kapcsolódva fordulnak elő (152, 153). Különböző stimulus hatására a Ku70 faktor az acetilációját követően, míg a VADC2 a proapoptotikus faktorok hatására (tBid, BIM, BAD) leválik (153, 154). Ekkor a Bax és Bak monomerekhez különböző proapoptotikus faktorok (tBid, BIM, Puma) kapcsolódnak a BH3 alegységükön keresztül, aminek hatására aktiválódnak, és a külső membránban oligomerizációjukat követően pórust nyitnak. A Bax és a Bak mennyisége természetesen különböző stimulus hatására tovább növekedhet a citoszolban, és így a külső membránban is. (155, 156). A Bcl-2, Bcl-xL antiapoptotikus faktorok a Bax és Bak fehérjéken kívül kapcsolódhatnak az ezeket a fehérjéket aktiváló proapoptotikus faktorok (tBID, BIM, BAD) BH3 alegységéhez is, gátolva a Bax és a Bak membránba helyeződését és oligomerizációját (157). Így az külső pórusnyíláshoz szükség van

arra is, hogy a proapoptotikus Bad fehérje kapcsolódjon a Bcl-2, Bcl-xL fehérjékhez (157) (13. ábra).



13. ábra A BAX és BAK pórusok. A BAX és BAK homooligomerek és heterooligomerek a mitokondrium külső membránjában pórust nyitnak, és lehetővé teszik a proapoptotikus faktorok (Cyt-C, Smac/Diablo, HtrA2/Omi, AIF, ENDO-G) kiszabadulását, és a makrofág sejtek apoptózisát.

A CypD szabályozza a külső membránjában lévő pórusok nyílását és az apoptózist

LPS kezelés hatására megnövekszik a Bax és Bak mennyisége a klasszikusan aktivált makrofág sejtekben, és a mitokondrium külső membránjában egyaránt (158, 159, 160, 161). A BAX és a BAK valamint a VDAC a mitokondrium külső membránjában nyit pórust. A mitokondrium mátrixában található CypD pedig számos kórfolyamat esetén csökkenti az apoptózist, a külső pórusnyílás gátlásán keresztül: az iszkémia-reperfúziót és az infarktust követően a szívizomszövetben, LPS kezelést követően a májzsövetben, az oxidatív stressz indukcióját követően az idegszövetben. Valamint a CypD gátolja a hasnyálmirigy β -sejtjeinek az apoptózist is (162, 163, 164, 165). Az irodalomban olvashatjuk azt is, hogy a CypD túlzott expressziója a belső pórusok nyílása, és a mitokondrium duzzadása mellett kiváltja a külső pórusok nyílását is, és ehhez kapcsolódóan a sejthalált (166). Azonban azt még nem ismert, hogy a mitokondrium mátrixában lévő CypD fehérje, hogyan szabályozza a külső pórus nyílását. A makrofágok esetében a leghetesebb válasz az, hogy a belső pórusnyílás indukálta jelentős mértékű oxidatív stressz váltja ki a külső pórusnyílást és ebből adódóan az apoptózist (167, 168, 169, 170).

A belső mitokondriális membránban lévő pórusok

Az ANT

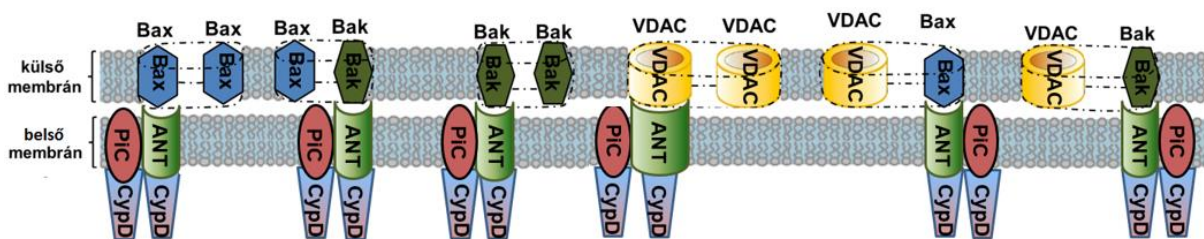
Az ANT fehérjének 3 izoformája van (ANT1-3). ANT1 és ANT2 minden emlősben megtalálható, míg az ANT3 csak az emberben fordul elő (134). Az ANT (adenin-nukleotid transzlokátor) a belső membránban elhelyezkedik el, és a citoszolban található ADP molekulákat cseréli le a mátrixban található ATP molekulákra. Az ANT emellett a belső membránban pórust is nyithat. Az ANT ADP/ATP-kötő helyének pozíciója alapján c- és m-fázisú konformációval rendelkezik. Az m-fázisú konformációról akkor beszélünk, amikor a kötőhely a mátrix felé tekint, c-fázisú konformációról pedig akkor, amikor a citoplazma felé tekint. Abban az esetben, ha ANT ligandok (ADP/ATP) az m-fázisú ANT-hez kötődnek, gátolják, ha a c-fázisú kötőhelyekhez kapcsolódnak, akkor pedig kiváltják a belső pórus nyílását (171). Az ANT belső membránban való pórus nyitását igazolja, hogy a belső pórus nyílását és mitokondriális membránpotenciál csökkenését az ADP és a brongkrekic sav is gátolja (171, 172). Az ANT pórusnyitását a mátrixban az ANT fehérjéhez közvetlenül kapcsolódó CypD fehérje is kiváltja (14. ábra). Ezt igazolja, hogy CsA a CypD fehérjéhez kapcsolódva, meggátolja, hogy a CypD kapcsolódjon az ANT fehérjéhez, és így gátolja a belső pórus nyílását (173). A CypD a kapcsolódását követően valószínűleg az ANT c-fázisú konformációjának a megjelenését váltja ki. Az ANT pedig csak ebben a konformációban képes a belső pórus nyitására (174). Az ANT fehérje a VDAC és a CypD fehérje mellett fizikailag kapcsolódik a Bax és a Bak fehérjékhez is, létrehozva a két membránon átívelő pórust (14. kép) (175-177).

Az FOF1 ATP szintáz dimerek

A belső membránban pórust nyitnak az F_oF₁ ATP szintáz dimerek is (178) (15. ábra C). A CypD több helyen is kapcsolódik az F_oF₁ ATP szintázhoz. Egyrészt kapcsolódik az ATP oligomerek oldalsó szárának B és D alegységéhez (179) másrészt az ATP dimerek oligomicin érzékenységgel rendelkező fehérje alegységéhez (178). Miután a CypD az anorganikus foszfát jelenlétében kötődik az oldalsó szár b és d alegységéhez, szignifikánsan lecsökkenti az F_oF₁ ATP szintáz aktivitását, amely egyaránt érinti az ATP szintézist és az ATP hidrolízist is (179). Abban az esetben, ha a CypD az ATP oligomicin érzékenységgel rendelkező fehérje alegységéhez kapcsolódik, ATP dimerek pórust formálnak a belső membránban (178). A belső membránban a pórus kialakításában az F_o C alegysége is részt vesz (180). A belső membránban az ATP dimerek pórus nyitását a CypD váltja ki, míg a specifikus ATP szintáz inhibitor az AMP-PNP (γ -imino ATP, egy nem hidrolizálható ATP analóg), az ADP, a CsA és a Mg²⁺ ionok gátolják (191). A CsA a CypD fehérjéhez kapcsolódva meggátolja, hogy a CypD kapcsolódjon az F_oF₁ ATP szintázhoz. Az F_oF₁ ATP szintáz a mitokondrium belső membránjának betüremkedéseiben helyezkedik el (15. ábra). Abban az esetben, ha a dimerek pórust nyitnak, a szintázon keresztül protonok jutnak a kriszták belső teréből a mátrixba, és ezzel a mitokondrium membránpotenciálja megváltozik, és az ATP szintézis zavart szenved. Így a CypD gátlása biztosítja az ATP szintézist.

A foszfát karrier (PiC)

Azt, hogy ANT és F_oF₁ ATP szintáz mellett valami más is pórust nyit a belső membránban, az igazolja, hogy az ANT hiányában jelentős mértékben lecsökken a belső pórusnyílás Ca²⁺ érzékenysége, amire az ADP, az ANT és az F_oF₁ ATP szintáz gátlószere, nincsen hatással (192). Ebben az esetben, a belső membránban helyet foglaló foszfát karrier (PiC) - amely normál körülmények között a H⁺ ionok kotranszportjával az anorganikus foszfát (Pi) felvételét biztosítja a mátrixba – fokozza a kalcium indukálta mPTP nyílását, úgy hogy egy nem specifikus belső pórust nyit, melyen keresztül a Ca²⁺-ionok mozoghatnak (193, 194). A CypD közvetlenül kapcsolódik a belső membránban helyet foglaló PiC fehérjéhez, és valószínűleg kiváltja a PiC konformáció változását, és egy újabb pórus megjelenését (195, 196). A CsA pedig szintén gátolja, hogy a CypD kapcsolódjon a PiC fehérjéhez (183). A PiC fehérje a CypD mellett az ANT fehérjéhez is kapcsolódik (196) (14. ábra). Így a CypD a PiC fehérjéhez kapcsolódva egy további, Ca²⁺ ionokra érzékeny belső pórus megjelenését váltja ki.



14. ábra A két membránon átívelő mitokondriális pórusok. A külső membránban elhelyezkedő Bax és a Bak proapoptotikus faktorok közvetlenül kapcsolódhatnak a külső membránban helyet foglaló VDAC fehérjékhez, valamint a belső membránban található ANT fehérjéhez. Az ANT ezen kívül még kapcsolódhat a PiC fehérjéhez is. A CypD fehérje az ANT és a PiC fehérjéhez egyaránt kapcsolódik, és szabályozza pórusnyitásukat a belső membránban.

A CypD szabályozza a belső membránban lévő pórusok nyílását

A CypD tehát közvetlenül kapcsolódik és a F_oF₁ ATP szintáz dimerekhez (15. ábra C), a PiC és az ANT fehérjékhez, és kiváltja a belső membránban a pórusok megjelenését (14).

ábra). Abban az esetben, ha a CsA kapcsolódik a CypD fehérjéhez és meggátolja kapcsolódását a belső membránban lévő fehérjékhez, gátolja a pórusok megjelenését (173, 174, 178, 180, 184, 185).

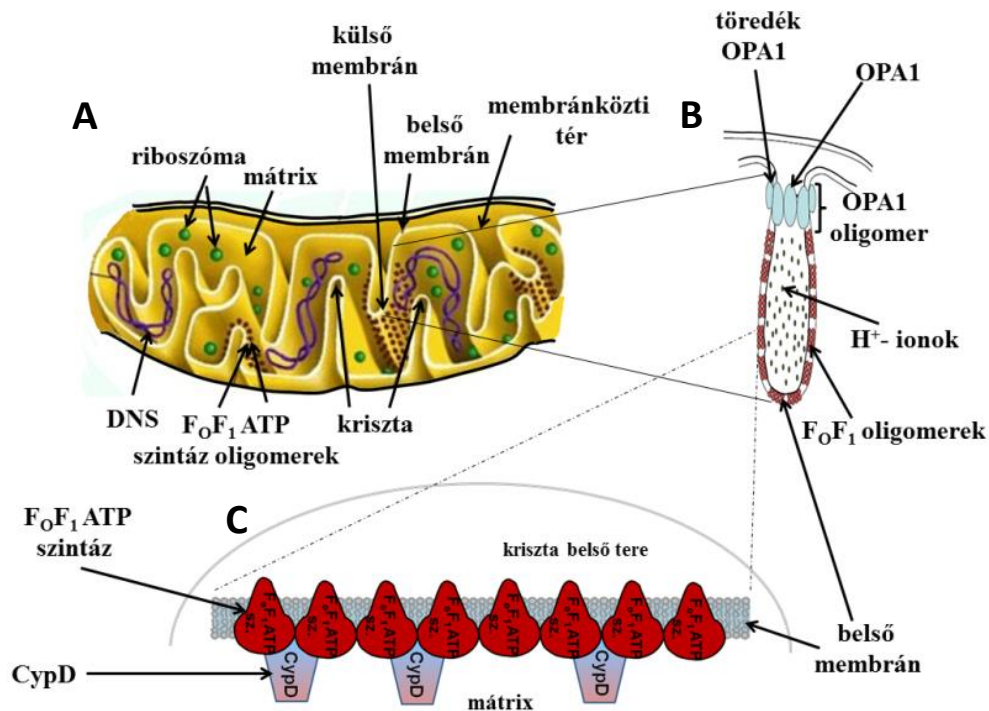
A CypD a belső pórusnyílásán keresztül szabályozza a mitokondrium szerkezetét és az oxidatív stresszt

CypD kiváltja a mitokondrium duzzadását és a kriszták szerkezeti átalakulását

A CypD a PiC, az ANT fehérjékhez és az F_0F_1 ATP szintáz dimerekhez való kapcsolódását követően egyértelműen kiváltja a mitokondrium belső membránjában a pórusok nyílását. A belső pórusok nyílása azonban normál körülmények között is megtörténik, de ilyenkor a pórusok kis számban és rövid ideig vannak nyitva, ami nem okoz különösebb változást. De abban az esetben, ha a pórusnyílás fokozódik, azaz egyre több belső pórus nyílik ki, elkezd folyadék áramolni a citoszolból a mitokondrium mátrixába, és a mitokondrium duzzadásnak indul, miközben a belső membrán kriszta szerkezete lassanként megszűnik (186). A kriszta szerkezet a belső membrán befűződéseiből alakul ki. Ennek a szerkezetnek a létrehozásában és fenntartásában részben a belső membránban elhelyezkedő OPA1 oligomer gyűrűk felelősek (187). A kriszta szerkezet fenntartása rendkívül fontos, mivel egyrészt jelentősen megnöveli reakció felszínt, aminek köszönhetően nagyobb mennyiségben lehetnek jelen a belső membránban a légzési lánc és az F_0F_1 ATP szintáz komplexei. Emellett, a belső membrán befűződési által elkülönített terek, lehetővé teszik, hogy nagy protongrádiens alakulhasson ki a krisztákon belüli tér és a mátrix között. A protongrádiens a légzési elektron transzport lánc komplexei (komplex I, III, IV) hozzájárulnak létrehozásához, melyek protonokat pumpálnak a mitokondrium mátrixából az intermembrán térbe. A protongrádiens pedig az F_0F_1 ATP szintáz katalizálta ATP szintézishez kell. A kriszták membránjában az F_0F_1 ATP szintáz dimerjei oligomereket alkotva biztosítják a fokozott ATP szintézist (188, 189) (15. ábra). Amint a belső membránban a pórusok kinyílnak, és a kriszta szerkezet megszűnik, az ATP szintáz oligomer szerkezete felbomlik és ATP dimerek jelennek meg (190). Az ATP dimerek a CypD kapcsolódását követően – valószínűleg már jóval a kriszta szerkezet megszűnése előtt is – pórust nyitnak. Ennek a belső pórusnak a megjelenése együtt jár a protongrádiens megszűntével, mivel a belső pórusnyílást követően protonok áramolnak a mátrixba. A kriszta szerkezet megszűnéséhez az antiapoptotikus tBid fehérje is szükséges, mely megszünteti az OPA1 fehérje oligomer szerkezetét (191, 192) (15. B ábra). A kriszta szerkezet megszűnését szabályozza, az intermembrán térben lévő proapoptotikus AIF is, mivel az AIF részt vesz ennek a struktúrának a kialakításában (193). Így amint a külső pórus kinyílik, és a proapoptotikus AIF az intermembrán térből kiszabadul a citoszolba, kiváltja a kriszták megszűnését.

A mitokondriális szerkezetet stabilizálja még a kardiolipin is, mely a belső membránban helyezkedik el és nagy mennyiségben köti az apoptózist kiváltó Cyt-C fehérjét. A kardiolipin hiányában abnormális felépítésű mitokondriumok jelennek meg. A mitokondrium szerkezetét nemcsak a belső membránban található OPA1 szabályozza, hanem az OPA3 is, melynek hiányában megindul a mitokondriumok feldarabolódása, és az apoptózis. Emellett az OPA1 nemcsak az krisztákat lezáró OPA1 oligomereket hozhatják létre, hanem valószínűleg a különböző krisztákat össze is köthetik. Valamint a mitokondriumok egyesülésekor, biztosítják a belső membránok kapcsolódását. Ugyanakkor már olvashattuk, hogy a makrofágok esetében az oxidatív stressz ki tudja váltani az mPTP nyílását, a mitokondrium feldarabolódását és az apoptózist. Ezek az eredmények mind azt mutatják, hogy a mitokondrium hálózatos és krisztás szerkezetét kialakító faktorok egyaránt szabályozzák az mPTP-t, a mitokondriumok feldarabolódását és a sejthalált is. Bár a mitokondrium krisztás szerkezetének a megszűnése és a mitokondrium feldarabolódása, mindenképpen kiváltja a sejthalált, addig a sejthalál

bekövetkezhet a mitokondriumok feldarabolódása nélkül is. Ez utóbbi esetben a mitokondrium külső membránjában lévő pórusok valószínűleg nagyobb mértékben fognak megjelenni, mint a belsők.



15. ábra A mitokondrium kriszta szerkezete. A mitokondrium belső membránjának betüremkedései hozzák létre a kriszta szerkezetet (A). A kriszták membránjában csoportosulnak a légzési lánc komplexei, valamint az oligomer szerkezetet alkotó F_0F_1 ATP szintáz dimerek (B). Így ez a szerkezet lehetővé teszi, hogy H^+ -ionok halmozódjanak fel a kriszták belső terében, lehetővé téve a fokozott ATP szintézist. A kriszta szerkezet létrehozásáért és fenntartásáért részben a belső membránban helyet foglaló OPA1 oligomerek felelősek (B). Az F_0F_1 ATP szintáz dimerek a CypD fehérje kapcsolódását követően pedig pórust nyitnak a belső membránban (C).

A CypD a protongrádiensen keresztül is szabályozza a membránpotenciált

A protongradiens fenntartása nemcsak az ATP szintézishez szükséges, hanem a mitokondrium fiziológiai membránpotenciáljának kialakításában is elengedhetetlen. Ez abból adódik, amikor elektrontranszportlánc (ETC) tagjai protonokat pumpálnak a mátrixból a kriszták belső terébe, kialakítják a mátrix negatív potenciálját (194, 195). Amikor az elektrontranszportlánc működése felborul és az ATP szintézise zavart szenved, akkor az F_0F_1 ATP szintáz elkezd hidrolizálni a glikolízisből származó ATP-t, hogy az ETC komplexei protonokat (H^+ ionokat) pumpáljanak a mátrixból a kriszták belső terébe. Abban az esetben, ha a CypD jelen van és kapcsolódik az ATP szintáz oldalsó szárának b és d alegységéhez (179) gátolja az ATP szintáz hidrolitikus aktivitását. Így a CypD gátlása nemcsak a belső pórusok nyílását fogja gátolni, hanem biztosítja az ATP szintáz membránpotenciált stabilizáló hidrolitikus aktivitását is.

A CypD a belső pórusnyíláson keresztül szabályozza a mitokondrium ROS termelését

Abban az esetben, amikor a CypD hatására a belső pórusok kinyílnak, az elektronokat transzportáló légzési lánc komplexeinek működése jelentős zavart szenved, és elektronok válnak le. Az elektronok legfőképpen a légzési lánc I-es komplexéről (NADH dehidrogenáz) válnak le (196, 197). Ezek az elektronok a szabad gyökök kialakításában vesznek részt. Normál körülmények között is szivárognak elektronok a légzési lánc tagjairól, de ez csak nagyon kicsi mértékű, és a sejtek az antioxidáns enzimákkal, és

antioxidánsokkal ki tudják védeni károsító hatásukat. LPS kezelés hatására azonban jóval nagyobb mennyiségben válnak le elektronok, melyek a molekuláris oxigénhez kapcsolódva rendkívül reakcióképes szuperoxid gyököket ($\bullet\text{O}_2^-$) hoznak létre. A szuperoxid gyökökből pedig hidrogén-peroxid (H_2O_2) keletkezik a mitokondriális (SOD2) és a citoplazmatikus (SOD1) szuperoxid-dizmutázok hatására (198). A hidrogén-peroxid reakciókészsége kisebb, mint a szuperoxid gyöké, de mivel membránoldékony, a membránokon áthaladva nagyobb távolságban is ki tudja fejteni károsító hatását. A hidrogén-peroxidból mieloperoxidáz reakció során hipoklóros sav (HOCl) képződik, amely szintén lipidoldékony, és rendkívül reakcióképes. Amennyiben az oxidatív stressz tartósan és magas értéken áll fent, a mitokondriumban található vas-kén fehérjék oxidatív sérülése során vas ionok (Fe^{2+} , Fe^{3+}) szabadulnak fel. A vas ionok hatására a Fenton reakcióban a hidrogén peroxidból hidroxil ($\bullet\text{OH}$) és perhidroxil ($\bullet\text{OOH}$) gyök jön létre, míg a Heber és Weis reakció során a hidrogén-peroxidból és a szuperoxid gyökből hidroxil gyök jön létre (199). Az oxidatív stressz a lipidek oxidációját is kiváltja, amely során alkoxi ($\text{RO}\bullet$) és peroxi ($\text{ROO}\bullet$) gyökök keletkeznek. Továbbá a lipidek és nukleobázisok oxidatív károsodása során hidroperoxid (ROOH) is keletkezik (200–211). Szuperoxid gyök és hidrogén-peroxid a nem megfelelően végbemenő enzimikus reakciók során is felszabadulhat. A monoamin oxidáz, az α -ketoglutarát dehidrogenáz komplex (KGDHC) és a piruvát dehidrogenáz komplex (PDHC) működése során is keletkezhet szuperoxid gyök és hidrogén-peroxid is (201, 202). A citokróm p450 és a fagoszómákban található NADPH oxidáz is állíthat elő reaktív oxigén fajtákat (203, 204). A fent említett gyökök a hidrogén-peroxiddal együtt a reaktív oxigén fajták (ROS) közé tartoznak.

Az LPS kezelés hatására megjelenő nitrogén-monoxid gyök

Az oxidatív stressz kialakításában azonban nitrogén-monoxid gyökök ($\bullet\text{NO}$) is részt vesznek. A nitrogén monoxid a reaktív nitrogén fajták (RNS) közé tartozik, és az LPS stimulus hatására a makrofágokban megjelenő indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) az α -argininből és molekuláris oxigénből állítja elő, miközben citrulin is keletkezik. A nitrogén-monoxid gyök azonban reakcióba tud lépni a szuperoxid gyökkel, és egy rendkívül reakcióképes gyök, a peroxinitrit (ONOO^-) jön létre (200, 205).

Az oxidatív stressz funkciója az LPS-el kezelt makrofágokban

Az LPS kezelés hatására a makrofágokban jelentősen megnövekszik a ROS és az RNS szintje, aminek feladata a patogének fehérjeinek, lipidjeinek és örökítő anyagainak a károsítása. Itt meg kell említenünk azt is, hogy az oxidatív stressz kialakításáért az irodalom alapján főként a mitokondriális ROS tehető felelőssé (197, 206). Az oxidatív stressz azonban nemcsak a patogéneket, hanem a makrofágok lipidjeit, fehérjéit és DNS-ét is károsítja, miközben további gyököket hoz létre. A makrofág sejt természetesen védekezik az oxidatív stressz károsító hatásaival szemben. Így az LPS kezelésre megnövekszik a szuperoxid-dizmutázok (SOD1 és SOD2) mennyisége, mely biztosítja szuperoxid anionok eltávolítását, és a hidrogén-peroxid megjelenését. Annak ellenére, hogy LPS kezelésre a glutation peroxidáz és a katalázok mennyisége nem változik (198), mégis jelentős funkciót töltenek be, mivel a hidrogén peroxidot vízre és molekuláris oxigénre bontják. LPS kezelésre ugyanakkor megnövekszik a hidrogén-peroxidot eltávolító peroxiredoxinok (205), az oxidált peroxiredoxinokat redukáló szulfiredoxinok (207) és az oxidált tioredoxinokat redukáló tioredoxin reduktázok mennyisége (208, 209). A tioredoxinok a fehérjék oxidációja során megjelenő diszulfid hidakat szüntetik meg. Az oxidatív stresszel szemben még a sejtekben előforduló antioxidánsok (A-vitamin, C-vitamin, E-vitamin, húgysav, glutation) is védelmet nyújtanak. Annak ellenére, hogy a makrofág sejtek az antioxidáns enzimek mennyiségének növelésével védekeznek a saját maguk által termelt reaktív oxigén és nitrogén fajtákkal

szemben, mégsem gátolják meg az LPS kezelést követően megjelenő oxidatív stresszt, főként a hidrogén peroxid és a nitrogén-monoxid gyökök termelését, mivel ezek a mikroorganizmusok és toxinjaik károsítását biztosítják (197, 210, 211).

A CypD szabályozta oxidatív stressz kiváltja a mitokondrium feldarabolódását és a sejtek halálát

A mitokondrium valójában hálózatos szerkezetű, azaz hosszabb, rövidebb elágazó vagy el nem ágazó fonalakból áll. A mitokondriális hálózat élete során folyamatosan megújul. Új mitokondriumok jönnek létre, melyek a régi részekkel összeolvadnak. Ezt a jelenséget mitokondriális fúzióknak nevezzük. Ha az oxidatív stressz tartósan hosszú ideig áll fent, és a mitokondrium fehérjéi, lipidjei és főként a mitokondriális DNS már visszafordíthatatlan módon károsodik, megindul a mitokondriumok feldarabolódása, a sérült részek leválása, egyes esetekben a levált részek aggregációja, és végül a degradálódása (212). A mitokondrium a mitofágiának nevezett jelenség során degradálódik. Abban az esetben, ha a mitokondriumok funkcióját, a mitokondriumok feldarabolódásával, és az új mitokondriális részek fúziójával már nem lehet pótolni, megindul az mitokondrium által szabályozott apoptózis (212). Ezt igazolja az is, ha a mitokondrium feldarabolódását gátoljuk, akkor fokozódik a mitokondriumok fúziója, és az apoptózis gátolt. Ugyanakkor, ha a mitokondriumok egyesülését gátoljuk, akkor a feldarabolódás fokozásával kiváltjuk az apoptózist (137; 138). Az oxidatív stressz pedig ki tudja váltani a mitokondrium feldarabolódását, a mitofágiát és a sejtek apoptózisát (169, 170). A makrofágok pedig az LPS stimulus követően meglehetősen nagymértékben termelnek reaktív gyököket, melyeknek a feladata a mikroorganizmusok eltávolítása (210, 211). Egy cikk megemlíti, hogy az élesztő sejtekben a proapoptotikus BAX is ki tudja váltani a mitokondriumok feldarabolódását (213), melynek szintje a makrofág sejtekben az LPS stimulus hatására jelentős mértékben megnövekszik a citoszolban és a mitokondrium külső membránjában is (158, 159, 160, 161).

Az oxidatív jelátvitel

Az oxidatív stressz nemcsak a mitokondrium feldarabolódását váltja ki azzal, hogy károsítja a mitokondrium DNS-ét, fehérjéit valamint lipidjeit, hanem az oxidatív jelátvitel kialakításáért is felelős. Az oxidatív jelátvitel kialakításában a hidrogén peroxid elengedhetetlen, mivel a membránokon átlépve nagyobb távolságban is ki tudja fejteni hatását. Az LPS indukció során megnövekszik a SOD1 és a SOD2 mennyisége a makrofágokban, melyek a szuperoxid anionból hidrogén-peroxidot állítanak elő (198). Emellett az intermembrán térben további hidrogén-peroxid jelenik meg a p66Shc redox enzimek működésekor is (114). A mitokondrium belső membránjában található kardiolipin peroxidáz aktivitással rendelkezik (115), és hidrogén-peroxid jelenlétében, lehasítja a hozzá kapcsolódó Cyt-C fehérjét, mely ezt követően a külső póruson keresztül távozik (216). Az oxidatív stressz szükséges a LPS stimulus mellett a tüdőben az NF- κ B teljes aktivációjához is. Ugyanis, amikor az oxidatív stresszt NAC (N-acetil-cisztein) antioxidánsal gátolták, szignifikánsan lecsökkent az NF- κ B aktivációja (217). Ugyanezt látták a tüdőben, abban az esetben is, amikor a tüdőben ROS egyik forrásának a NADPH oxidáznak egyik alegységét kódoló gént kiütötték (218). Emellett a NAC (1mM) a tüdő endotél sejtjeiben 5 órával az LPS (300 mg/ml LPS) kezelést követően szignifikánsan lecsökkentette a p38 aktivációját (230). Ugyanakkor a hidrogén-peroxid kiváltja a JNK aktivációját valamint a fokozott ROS termelés az ERK1/2 aktivációját tüdő endotél sejtjeiben (220, 221). Így egyértelműen elmondhatjuk, hogy a tüdő endotél sejtekben az oxidatív stressz fokozza a JNK, a p38 aktivációját és az ERK1/2 aktivációját. Emellett a NAC (\geq 1mM) a tüdő epitel sejtjeiben is gátolja az LPS és a hidrogén-peroxid kezelést követően a p38 aktivációját (128, 133). Emellett a tüdőben epitel

sejtjeiben a hidrogén-peroxid önmagában a p38 aktivációját közel a négyszeresére a JNK1/2 foszforilációját legalább háromszorosára, az ERK1/2 aktivációját közel kétszeresére, míg az Akt aktivációját csak kis mértékben, de szintén szignifikánsan fokozza (222, 132). A makrofágokban a NAC az LPS indukciót követően az oxidatív stressz csökkentésével az ERK1/2, p38 aktivációját is gátolja, miközben a JNK aktivációját fokozza (206). Annak ellenére, hogy a NAC képes gátolni különböző sejtípusokban a MAP kinázokat valamint az NF- κ B transzkripciós faktort, csak az oxidatív stressz gátlásával nem biztosítja a szepszisben szenvedő állat túlélését (223). A makrofágokban az oxidatív stressznek az Akt fehérjére gyakorolt hatása kettős, azaz serkenti és gátolja is az Akt aktivációját. A LPS kezelés hatására megjelenő oxidatív stressz a PTEN (phosphatase and tensin homologue) gátlásán keresztül fokozza az Akt aktivációját (224). A PTEN normál körülmények között gátolja az Akt aktivációját, avval hogy visszaalakítja a membránban felhalmozódó foszfadilinozitol-3,4,5-triszfoszfátot (PIP3) foszfadilinozitol-3,4-biszfoszfáttá (PIP2) (224). A fokozott és hosszú ideig tartó oxidatív stressz azonban gátolni is tudja az Akt aktivációját. Ugyanis az Akt fehérjék ciszteinjeinek oxidációjával diszulfidhidakat alakít ki, ami lehetővé teszi, hogy az Akt fehérjékhez kapcsolódjon a foszfoprotein foszfátáz-2a fehérje (PP2a), ami az Akt kinázt defoszforilálja, inaktiválja (225). Az oxidatív stressznek az Akt aktivációjára gyakorolt hatását valószínűleg az Akt kináz aktivációját serkentő és gátló folyamatok eredője fogja meghatározni. Emellett az oxidatív stressz fokozza a belső pórusnyílását is (226). Ennek egyik módja az, amikor az ANT fehérje 56. helyzetű ciszteinje oxidálódik, ebben az esetben a CypD jobban kötődik az ANT fehérjéhez és kiváltja a belső pórusok nyílását (227).

Az ECSIT hatása a NADH dehidrogenáz ROS termelésére

A mikroorganizmusok és toxinjaik oxidatív károsítása a makrofág sejteken belül is lezajlik, ebben az esetben a mitokondriumok körülveszik azokat a fagoszómákat, melyek a TLR4 receptorhoz kapcsolódó fagocitált patogéneket (Gram-negatív baktériumok), vagy toxinokat (LPS) tartalmazzák, és oxidatívan károsítják azokat (211). Mint már említettem a NADH dehidrogenáz felelős főként az LPS indukciót követően a reaktív oxigén gyökök megjelenéséért. Az LPS pedig a jelátviteli folyamatokon keresztül képes szabályozni a NADH dehidrogenázról leváló elektronok mennyiségét. Ugyanis a TLR4 jelátvitelénél során aktiválódó TRAF6, ubiquitinálja az ECSIT fehérjét, mely ezt követően nagy mennyiségben megjelenik a mitokondrium belső membránjában, és nagy valószínűleg kiváltja az elektronok leválását az I-es komplexről (211). Az ECSIT fehérje a TAK1/TRAF6 komplex részeként elengedhetetlen az NF- κ B aktivációjában is (228). Ugyanakkor az ECSIT és a TRAF6 fehérje egyaránt szükséges ahhoz is, hogy a mitokondriumok körbevegyék az LPS-t tartalmazó fagoszómákat (211).

A szepszis kezelése

Amerikában évente több mint 750 000 embert kezelnek súlyos szepszissel (21, 22), és egy becslés szerint évente 19 millió eset fordulhat elő világszerte (229). Ugyanakkor a szepszisben szenvedő betegeknek 60%-a a hatvanötödik életévét betöltött korcsoportból kerül ki. A mortalitási adatokat vizsgálva, a modern egészségügyi beavatkozások ellenére, a szepszisben elhalálozó betegek 75%-át teszik ki a 65 évnél idősebb emberek (230). A szepszis a fiatalabb korosztályban sokkal ritkábban jelenik meg, és a mortalitása is jelentősen kisebb mértékű. Ezt jól szemlélteti az az Amerikai Egyesült Államokban készült felmérés, mely arról számol be, hogy 10000 gyermekből évente 2, míg 10000 85 évnél idősebb ember esetében pedig évente 262 ember betegszik meg szepszisben. Ugyanakkor a szepszis mortalitása a fiatal populációban 10%-os, az idősekében pedig 38%-os (231). A korcsoportok közötti

különbség abból adódik, hogy az idősebb emberek immunrendszere már messze nem olyan hatékonyan működik (232). A szepszist túlélő beteg esetében még azt is figyelembe kell venni, hogy a kórházi kezelést követően a szepszis következményeként a szervek károsodnak, ami tovább gyengíti a szervezetet. A szepszist különböző mikroorganizmusok váltják ki (vírusok, gombák, és baktériumok). Jelenleg pedig csak antibiotikus kezelés folyik az intenzív osztályokon. Ugyanakkor elkezdtek megjelenni a multirezistens baktériumok, ebből adódóan a jelenlegi kezelés sem biztosíthat már sokáig megoldást. Így egyre sürgetőbbi válik, hogy új és hatékonyabb megoldást találjunk a szepszis kezelésére.

A szepszis kezelésénél figyelembe kell venni, hogy a gyulladás és az immunfolyamatok a kórfolyamat előre haladásával folyamatosan változnak. Így kezdetben az elsődleges fertőzés során fellépő szisztémás gyulladást, valamint a súlyos szepszis során a többszervi diszfunkciós szindróma klinikai tüneteit kell csökkenteni. Később az immunrendszer legyengüléséből adódóan megjelenő másodlagos fertőzések kialakulását kell elkerülni. A legjobb megoldás a fentiekből adódóan az lenne, ha az immunfolyamatokat és a gyulladást kezdetben csökkenteni tudnánk, későbbiekben pedig erősítenénk az immunrendszer működését. Ez utóbbi azért is fontos, mivel a betegség többnyire idős, immungyenge betegeket érint. Emellett fontos, hogy a gyulladást szabályozó proinflammatorikus és antiinflammatorikus citokinek sejt és szervszintű termelését egy közepes értéken állítsuk be, valamint biztosítsuk a megfelelő keringést, oxigén és tápanyagellátást.

Jelenleg a szepszist a lázas ($\geq 38,5$ °C) betegetől levett vérben a prokalcitonin (PCT) és egyes németországi laborokban a PCT mellett a C-reaktív protein szint emelkedése alapján diagnosztizálják. Itt azonban meg kell említeni, hogy a PCT szenzitívebb és koraiabban (24 órán belül) markere a szepszisnek. A láz ($\geq 38,5$ °C) megjelenésekor levett vérből meghatározzák a betegséget okozó baktérium típusát is. A súlyos szepszis és a szepsztikus egyaránt intenzív osztályon történő kezelést igényel. Jelenleg a kórházakban antibiotikum kezelés folyik. Az antibiotikum kezelést az alapján határozzák meg, hogy a fertőzésnek mi volt a kiindulási helye a szervezetben, milyen mikrobiális környezetben (otthon, kórház) alakul ki, milyen a beteg kórtörténete valamint a kezelés helyén (kórház) milyen kórokozók fordulnak elő. Ha nem megfelelő antibiotikumot használnak, és a kezelés időben késik, az a beteg halálát okozhatja (233). Így az intravénás antibiotikum kezelést a lehető leghamarabb kell elkezdni, és olyan antibiotikumot kell választani, amely biztosan hatásos a felmerülő összes kórokozóval szemben. Általánosságban a kezelés során első lépésben olyan antibiotikum adása szükséges, amely a kórokozók széles körében hatásos, majd, ha van rá lehetőség, akkor a kórokozóra specifikus antibiotikumra kell váltani. Mivel a széles spektrumú antibiotikumok kiválthatják multirezisztens kórokozók kialakulását, valamint toxikus mellékhatásuk is van (234). Az még mindig nem egyértelmű hogy a kombinált antibiotikum kezelés, vagy egy megfelelő antibiotikum a hatásosabb (235, 236, 237, 238). Jelenleg úgy gondolják, hogy a kombinált antibiotikum kezelés akkor hatásos, ha a szepszist *Pseudomonas* fajok váltják ki, vagy a betegség tünetei közé tartozik a kórosan alacsony neutrofil szám (neutropénia) (235). Antifungális terápiát akkor alkalmaznak, ha a kandidiázis veszélye nagy (235). Ha a fertőzés gócéra, például tályog esetében, nem hat az antibiotikum, sebészi beavatkozás szükséges. Az antibiotikus kezelés mellett a komplikációk elkerülésének érdekében folyamatosan vizsgálják a beteg állapotát, és ha kell, mesterségesen segítik a szervek működését (pl.: gépi lélegeztetés). Az antimikrobiális szereknek és a szervek mesterséges működésének biztosításának köszönhetően, a betegek jelentős része túléli a kezdeti hiperinflammatorikus szakaszt, de ezt követően még így is jelen vannak a betegség nyomai, a szervek nem megfelelő működése. Azoknál a betegeknek, melyek túlélnek a szepszis hiperinflammatorikus szakaszát, és továbbra is intenzív ellátásban részesülnek, valamint bizonyítottan az immunszuppresszió tüneteit mutatják, és az antibiotikum kezelés ellenére, megjelennek a másodlagos bakteriális fertőzések vagy a látens vírusok újra aktiválódnak (7, 8, 32, 238, 239,

240, 241), szükség van az immunrendszer megerősítésére. A megfelelő gyógymód megtalálása ma még sürgetőbbé vált, mivel már elkezdtek megjelenni a multirezisztens baktériumok, melyekre már nem hatnak az antibiotikumok.

Immunerősítő citokinek a szepszis kezelésében

Számos klinikai tanulmány igazolja, hogy a granulocita monocita kolóniastimuláló faktor (GM-CSF) és a rekombináns humán IL-7 hatásos immunerősítő (242, 243). A GM-CSF aktiválja a neutrofil granulocitákat és a makrofágokat, emellett az immunszuppressziós szakaszban lecsökkenti a mesterséges lélegeztetés valamint a kórházi kezelés időtartalmát szepszisben szenvedő betegeknél (243). Az IL-7 citokin pedig kiváltja a memória T-sejtek osztódását, aktivációját, megnöveli vérben keringő CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtek számát, a T-sejtek receptorainak a diverzitását, a lép és a nyirokcsomók méretét és lecsökkenti a limfociták apoptózisát. Helyreállítja a lecsökkent INF γ szintet, mely a makrofágok aktivációjához szükséges, és fokozza a túlélést szepszisben (244, 245, 246, 247, 248). Egy másik hatásos immunerősítő citokin lehet az INF γ , mely a monociták és makrofágok aktiválásában vesz részt. Az INF γ helyreállítja a különböző szepszisben szenvedő betegeknél (LPS-indukálta és sztafilokokkális) immunszuppressziós szakaszából származó makrofágok csökkent proinflammatorikus citokinjének (TNF- α) a szekrécióját és makrofágok aktivitását (249, 250).

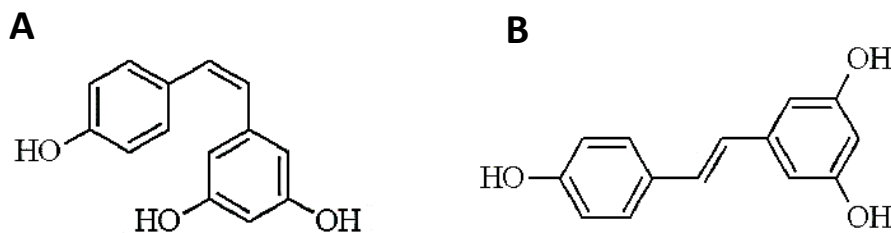
A gyulladáscsökkentő polifenolok a szepszis kezelésében

A polifenolok - melyeket megtaláljuk a gyümölcsökben, a zöldségekben, a szőlőben, magvakban és a virágokban - a növényvilág másodlagos anyagcsere termékei (251). Melyeket a növények a kártevők, az oxidatív folyamatok, a sérülések, és gombafertőzések valamint az UV sugárzás hatására termelnek (252) az antifungális és antibakteriális és antioxidáns tulajdonságaik miatt (253, 254, 255). Az antioxidáns, ill. szabadgyökfogó tulajdonságaikat különböző csoportjaiknak (hidroxil, aldehid) és a kettős kötéseiknek köszönhetik (256, 257). A polifenolok legalább egy fenolos gyűrűt tartalmaznak, amihez egy vagy több hidroxil csoport kapcsolódik, de ezeken kívül számos más csoport is kapcsolódhat hozzájuk. A polifenolok csoportjába tartoznak az egyszerű fenolok, fenolos alkoholok, a hidroxifahéjsavakat, fenilpropanoidok, benzoésavak, flavonoidok, stilbénok, tanninok, lignánok és ligninek valamint ezek származékai és polimerizált formái (252). Az állati szervezetekbe csak a növényi táplálék elfogyasztásával kerülhetnek be, mivel az állati szervezetek nem tudják előállítani. Ugyanakkor az elfogyasztott élelmiszerekben található polifenolok felelősek sok esetben a szín, aroma, kesernyés vagy savanyú íz és az illat kialakításáért (252). A polifenolok egy része a táplálkozást követően közvetlenül felszívódik és kifejti biológiai hatását, másik részük a bélben található mikroflóra metabolikus folyamatai során átalakul, és csak ezután hasznosul (258). A polifenolok egészségre gyakorolt pozitív hatásáról számos tanulmány számol. Így a polifenolok rákellenes, antiallergén, immunrendszert erősítő, trombózist megelőző, gyulladáscsökkentő, értágító, mikroba ellenes és antioxidáns tulajdonságokkal rendelkeznek (252-255, 258, 259).

A rezveratrol

A polifenolok közé tartozó rezveratrol stilbenoid szerkezettel rendelkezik (16 ábra). A rezveratrolnak egy cisz (16. A ábra) és egy transz (transz-3,4,5-trihidroxilstilbén) (16. B ábra) izoformája van. Biológiai aktivitása azonban csak a transz izoformának van (260). A rezveratrol megtalálható az étcsokoládéban, a mogyoróban, a szőlőben és nagy mennyiségben a vörös borban. Antioxidáns hatását egyrészt annak köszönheti, hogy a szabadgyökökkel reakcióba léphet mindhárom hidroxid-csoportja, valamint a kettős kötése is. A rezveratrol emellett avval is gátolja a gyulladást, hogy módosítja a jelátviteli útvonalakat és ennek

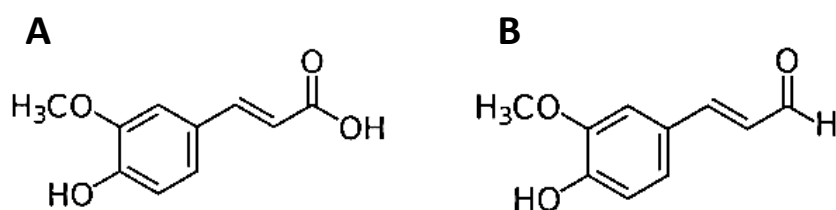
köszönhetően a génexpressziót. Így a rezveratrol az LPS indukálta szepszis esetén gátolja a makrofágokban (RAW_{267.4}) az NF- κ B transzkripciós faktor aktivációját, és az NF- κ B indukált gének, a COX-2, az iNOS, a TNF- α és az IL-1 β gének átírását. A rezveratrol gátolja még a makrofágokban gyulladást kialakító MAP kinázok aktivációját is, és fokozza a sejtek túlélését biztosító és a MAPK útvonalakat gátló Akt aktivációját (261-263). A rezveratrol a gyulladás mellett hatásos a szív és érrendszeri megbetegedéseket illetően, idegrendszeri betegségeknél (Alzheimer) és rákos megbetegedések esetén is (262, 264). Emellett az akut légúti sérülés (ALI) során a rezveratrol koncentrációfüggő módon gátolja a LPS kezelést követően megnövekedett proinflammatorikus citokinek mennyiségét, és a tüdő ödéma mértékét is (265).



16. ábra A cisz-rezveratrol és a transz-rezveratrol. A cisz-rezveratrol (A) and transz-rezveratrol (B) szerkezeti felépítése.

A ferulsav és a ferulaldehid

A polifenolok közé tartozó ferulsav (4-hidroxi-3-metoxi fahéjsav) a növényekben a fenilalaninból és a tirozinból jön létre a sikimát útvonalon (17. A ábra). Elsősorban magvakban fordul elő szabad formában, vagy pedig kovalensen kapcsolódik a ligninhez vagy más biopolimerekhez. Emellett megtalálható még a kávéban, a sörben, az édes kukoricában és a rizsben is. A ferulsav szabadgyök fogó képességét a 3-metoxi-csoportnak, a 4-hidroxi-csoportnak, a karboxil-csoportnak és a benzolgyűrűnek köszönheti. A szabad gyökökkel való reakció során a benzolgyűrű szénatomjai közötti kettő kötések felhasadnak, valamint a metoxi- és hidroxi-csoportok elektronokat veszítenek és a ferulsavból fenoxi gyök keletkezik. A fenoxi gyök rezonancia stabilitással rendelkezik, mely megállítja a szabadgyökök láncreakcióját (238). A ferulsavból a bélben található mikroflóra metabolikus folyamati során vízben jól oldódó ferulaldehid keletkezik (266, 267) (17. B ábra), ami az elő szerkezetben ferulsavvá alakul vissza (268). A ferulsav a rezveratrolhoz hasonló módon gátolja a gyulladást, mivel gátolja az LPS kezelést követően a makrofágokban az NF- κ B transzkripciós faktor aktivációját, és a NF- κ B indukálta gének a TNF- α , az iNOS és a COX-2 expresszióját, valamint a reaktív oxigén gyökök termelését (269-272). A későbbiekben bemutatásra kerülő eredményeink azt mutatják, hogy a ferulsav származéka a ferulaldehid szintén gátolja az LPS-indukálta MAP kinázok, az ERK1/2, a JNK1/2, a p-38 és az NF-B transzkripciós faktor aktivációját, és az iNOS, valamint a COX-2 génexpresszióját és az oxidatív stresszt. A ferulaldehid emellett még fokozza az MKP1 aktivációját. Az MKP1 pedig defoszforilációval inaktíválja a MAP kinázokat (210).



17. ábra A ferulsav és a ferulaldehid. A ferulsav (A) és a ferulaldehid (B) szerkezete.

A rezveratrol a CypD foszforilációjával gátolja az mPTP nyílását

A rezveratrol a gyulladást gátló hatását részben a belső mitokondriális pórusok nyílásának gátlásán keresztül fejt ki, mivel a rezveratrol a CypD fehérje foszforilációjával gátolja a szívizomszövet károsodását az iszkémia-reperfúziót követően. Ebben az esetben a rezveratrol fokozza a reperfúzió lejtászódása után a ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP)/protein kináz G (PKG) útvonalon a GSK-3 β (ser9) foszforilációját, és a mitokondriumba jutását. A foszforilált GSK-3 β a mitokondriumban pedig közvetlenül kapcsolódik a CypD fehérjéhez és gátolja a teljes pórus nyílását, és az izomszövet károsodását (273). A rezveratrolhoz hasonlóan a ferulsav is fokozza az idegsejtekben GSK-3 β (ser9) foszforilációját, de jelen esetben az Akt aktivációján keresztül (274, 275). A GSK-3 β kinázt a makrofágokban az LPS kezelés hatására pedig a PI3K/Akt útvonalon aktiválódó Akt1 szintén foszforilálja a 9. szerin aminosaván. A PI3K/Akt útvonalon azonban nemcsak az Akt1, hanem az Akt2 is aktiválódik, mely a foszforilációját követően bejut a mitokondriumba, és a foszforilálja a CypD fehérjét a 31. szerin aminosavon, amely ezt követően a belső pórusok nyílásának gátlásával jár (276).

A rezveratrol és a ferulsav és a ferulaldehid nagy valószínűséggel felépítésükben részt vevő azonos elemeknek köszönhetően hatnak azonos módon az LPS kezelést követően a jelátviteli folyamatokra. Ezért elképzelhető, hogy a ferulsav és a ferulaldehid a rezveratrolhoz hasonlóan gátolni fogja a belső mitokondriális pórusok nyílását szintén az Akt2 vagy a GSK-3 β és végül a CypD fehérje foszforilációján keresztül.

A PARP-1 fehérje funkciója a szepszis kialakításában

A poli (ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimnek 17 izomformája van. A PARP enzimeket számos stimulus aktiválhatja. Így a PARP-1 és a PARP-2 enzimek működését kiválthatják a fokozott oxidatív stressz során megjelenő egyszálú DNS törések. Ugyanakkor a PARP-1 enzim aktiválódik az LPS stimulus hatására is.

A PARP fehérjék biztosítják a DNS javítását és szabályozzák a génműködést

A PARP fehérjék különböző módokon járulnak hozzá a sejtek túléléséhez. A PARP-5a és PARP-5b például a telomerek hosszának fenntartásával növeli meg a sejtek életkorát. A PARP-5a és a PARP-5b három alegységgel rendelkezik (anakin ismétlődéseket tartalmazó, oligomerizációs, katalitikus), melyek közül az anakin ismétlődésekkel rendelkező alegység kapcsolódik a kromoszómák végén a telomerizációt gátló komplexhez, így biztosítva a telomerek hosszának fenntartását (277). Emellett a PARP-1 és a PARP-2 DNS-ben lévő egyszálú törések javításában is részt vesz, melyek létrejöhetnek fokozott oxidatív stressz során is. A PARP-1 egy DNS kötő, egy kaszpázok által hasítható, egy automodifikációs és egy katalitikus alegységgel rendelkezik. A DNS kötő alegység 2 cinkujj motívuma, a DNS-ben bekövetkező egyszálú töréseknél az enzimet a DNS-hez kapcsolják, amit az enzim konformációs változása követ. Majd a katalitikus alegység létrehozza a poli (ADP-ribóz) láncot, amely odavonzza a DNS hibajavítását végző enzimeket (DNS polimeráz β , a DNS ligáz III, XRCC1) (278). A hibajavítást követően az autómódosításon átmenő alegység biztosítja a fehérje leválását a DNS-ről. Abban az esetben, ha a DNS károsodás túlzottan nagymértékű, és nagyobb energia szükséges a javításhoz, mint amennyi rendelkezésre áll megtörténik a PARP fehérjéknek a kaszpáz vagy a katepszin enzimek általi hasítása, inaktivációja (279). A PARP-1 izomformáról már korábban leírták, hogy szabályozza DNS metilációját, az imprintinget. Ebben az esetben a CTCF fehérje mennyiségének a növekedése, mely a DNS CCCTC szekvenciájához kapcsolódik, önmagában kiváltja a PARP-1 automodifikációját, aminek a következtében a PARP-1 önmagát és a CTCF fehérjét is poli-ADP-ribozilálja. A PARP-1 ezt követően fizikailag kapcsolódik a DNS-metiltranszferázhoz. A metiltranszferáz ennek hatására pedig nem metilálja a DNS CpG dinukleotidjait, és így

lehetővé válik a gének kifejeződése (280). A PARP-1 más módon is képes szabályozni a génátírást, azaz a hiszton fehérjék poli-ADP-ribilizációjával kiváltja a kromoszómák dekondenzációját, lehetővé téve a génátírást (281).

A PARP-1 fehérje fokozza az LPS indukálta gyulladást

A PARP-1 kisebb mértékű aktivációja képes fokozni a gyulladást. Ugyanakkor a túlzott aktivációja kiváltja a sejtthálát. A PARP-1 gyulladást fokozó hatásával találkozunk azokban a makrofágok sejtekben, melyekben a megnövekedett PARP-1 mennyisége az NF- κ B koaktivátoraként fokozza a gyulladással gének expresszióját (282). Ugyanakkor az NF- κ B is az Egr1 és számos transzkripciós faktor mellett ki tudja váltani a PARP-1 génexpresszióját (283). Az NF- κ B pedig az LPS indukálta gyulladás kialakításának elengedhetetlen transzkripciós faktora. A PARP-1 gyulladásban betöltött kimagasló szerepét az cikk is bizonyítja, mely arról számol be, hogy a PARP-1 hiányának hatására a normális esetben halálos koncentrációjú LPS (40 mg/tskg, ip.) kezelést az egerek 90%-a túléli. Aminek háttérében részben az áll, hogy a PARP-1 $-/-$ egerek vérében az immunsejtek és szervek által termelt gyulladást kialakító citokinek (TNF- α , IFN- γ) szintje szignifikánsan lecsökkent a vad típusú egerekben mért értékekhez képest (278). A vérben a citokinek szintjének szignifikáns csökkenését megfigyelték PARP-1 $-/-$ egerekben a vakbél lekötését és kilyukasztását követően megjelenő szepszis során is (284). Ugyanakkor a PARP1 $-/-$ egerekből izolált peritoneális makrofágokban a PARP-1 hiánya az LPS (1 μ g/ml) kezelést követően szignifikánsan meggátolta az LPS indukálta NF- κ B aktivációját, és az NF- κ B-függő gén az iNOS génexpresszióját, valamint az NO mennyiségét jelző nitrit szintjét is (278). Ezeket az eredményeket vizsgálva elmondhatjuk, hogy a PARP-1 hiányának esetében teljesülnek azok a feltételek, melyeket korábban a szepszis kezelésénél megfogalmaztam. Tehát a PARP-1 hiánya gátolja a gyulladás hiperinflammatorikus szakaszát kialakító citokin viharának nevezett jelenséget, valamint az immunfolyamatokat. Mára már számos tanulmány született, melyek a PARP-1 gátlók hatását vizsgálták az egerekben lejátszódó szeptikus folyamatokban. A PARP-1 enzim aktivitását gátló 4-hydroxyquinazolinról leírták, hogy tovább fokozza az LPS-el (20 mg/tskg, ip.) kezelt egerek különböző szerveiben (tüdő, máj, lép) a túlélését biztosító Akt1 (Ser473, Thr308) aktivációját a PI3K/Akt útvonalon. Miközben szignifikánsan gátolja a gyulladást kialakító ERK, a p38 és az NF- κ B és az AP-1 aktivációját (285). A PJ34 PARP-1 gátlóról szintén leírták, hogy különböző szervekben szignifikánsan lecsökkentette az LPS (10 mg/tskg) kezelést követően az NF-kappaB aktivációját, az apoptózist és a nekrozist, miközben fokozza az Akt1 aktivációját (286).

A PARP-1 aktivációja a mitokondriális pórusok nyitásán keresztül hozzájárul a ROS termeléshez, az apoptózishoz és a nekrozishoz

A PARP gátlók a PI3K/Akt útvonalon az Akt1 (Ser473) és a GSK-3 β (Ser9) foszforilációjának fokozásán keresztül gátolták a mitokondrium hidrogén-peroxid indukálta belső pórusnyílását jelző depolarizációját (287). Ebből adódóan a PARP-1 hiánya nagy valószínűséggel a mitokondrium belső pórusnyílásán és ROS termelésén keresztül gátolta a vakbél lekötését és kilyukasztását követően kialakuló szeptikus folyamatokban a különböző szervekben (tüdő, lép) az oxidatív stressz mértékét (284). A PARP-1 azonban nemcsak a mitokondrium belső pórusnyílását képes kiváltani, hanem a túlzott aktivációja során képződő PAR képes kiváltani a mitokondrium külső pórusainak nyílását és az intermembrán térben lévő proapoptotikus faktor, az AIF kiszabadulását és a sejtmagba helyeződését (288). A PARP-1 túlzott aktivációja azonban nemcsak apoptózist, hanem nekrozist is okoz. Korábban már leírták, hogy a fokozott poli (ADP-ribóz) polimeráz reakcióval együtt jár a NAD⁺ és az ATP raktárak kimerülése és ennek köszönhetően a nekrozis. Ennek háttérében egyrészt az áll,

hogy a PARP-1 poli (ADP-ribóz) (PAR) előállításához szubsztrátként NAD^+ -ot használ. A NAD^+ pedig számos biokémiai ATP termelő biokémiai folyamathoz (glükolízis, aminosavak lebontása, β -oxidáció) szükséges. Másrészt a PARP-1 az ATP szint csökkenését a glükolízis egyik enzimének a hexokináznak a gátlásával éri el (289). Harmadrészt pedig a PARP-1 a PI3K/Akt útvonalon az Akt1 (Ser473) és a GSK3 β (Ser9) foszforilációján keresztül gátolja a mitokondrium belső pórusainak nyílását jelző depolarizációját. (287). Ami pedig együtt jár az elektrontranszportlánc működési zavarából adódóan a ROS termelésével és az ATP szintézis csökkenésével. Ugyanakkor, ha PARP-1 aktivációját követően megjelenő, a mitokondrium külső és a belső membránján átívelő pórusok rövid ideig vannak nyitva, apoptozist, ha pedig hosszabb ideig vannak nyitva, nekrozist váltanak ki (166, 284, 288, 287, 290, 291).

Célkitűzések

A CypD specifikus gátlószerének tartott CsA közvetlenül kapcsolódik a CypD fehérjéhez, és gátolja a CypD belső pórusokat nyitó hatását az izolált mitokondriumokban, a sejtekben a calcineurin gátlásán keresztül azonban gátolja a MAP kinázokat defoszforiláló MKP-1 fehérje expresszióját is, így fokozza a MAP kinázok aktivációját és a gyulladást. A CsA emellett gátolja még a ciklofilin A, B és C fehérjéket is (292). A ciklofilin A gátlásával immunszuppresszáns hatását fejtí ki, miközben a ciklofilin A és B gátlásával a proinflammatorikus citokinek szekrécióját szabályozza (293, 294, 295). Hogy kiküszöböljük a CsA nem specifikus hatásait, mi CypD deficiens és vad típusú egerekből izolált peritoneális makrofágokkal valamint az egerek tüdejével dolgoztunk.

1. Célunk volt, hogy megvizsgáltuk azt, hogy a vad típusú sejtekben az LPS kezelés valóban kiváltja-e a mitokondrium belső pórusainak nyílását és a mitokondrium evvel együtt járó depolarizációját. Valamint, hogy a CypD hiánya milyen mértékben gátolja a belső pórusok nyílását.

2. Meg akartuk tudni azt is, hogy a CypD hiánya a belső pórusok nyílásának gátlásával, milyen mértékben járul hozzá a mitokondrium ROS termeléséhez az LPS-el kezelt peritoneális makrofágokban. Ugyanakkor a mitokondrium ROS termelése hogyan hat a teljes sejt ROS termelésére.

3. Emellett célul tűztük ki azt is, hogy megvizsgáljuk, hogy a peritoneális makrofágokban a CypD hiánya a ROS termelés csökkenésén keresztül gátolja-e a gyulladás kialakításában elengedhetetlen NF- κ B aktivációját, és az NF- κ B indukált gének (TNF- α , iNOS) átírását. Valamint, az oxidatív stressz csökkenésével, növekszik-e a FoxO1 és a FoxO-3a transzkripciós faktorok inaktivációja, és a FoxO1 és a FoxO-3a transzkripciós faktorokat inaktiváló Akt aktivációja.

Annak ellenére, hogy a polifenolok közé tartozó ferulsav és rezveratrol szerkezeti azonosságai mellett szerkezeti különbségekkel is rendelkeznek, azonos módon gátolták a gyulladást kialakító MAP kinázok és az NF- κ B aktivációját. Sőt a rezveratrol az LPS-el kezelt makrofágokban gátolta még a mitokondrium pórusnyílását és depolarizációját a CypD foszforilációján keresztül, valamint fokozta az ATP termelését.

5. Így célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk azt is, hogy a RAW264,7 szekunder makrofág sejtekben a ferulaldehid mekkora mértékben gátolja az LPS kezelést követően a mitokondriumok belső pórusnyílását jelző mitokondriális depolarizációt. Valamint, hogy az LPS kezelést követően a ferulaldehid a teljes sejt ROS termelésére gyakorolt hatását az oxidatív stressz vagy a belső mitokondriális pórusok nyílásának gátlásán keresztül fejtí ki.

6. Meg akartuk tudni azt is, hogy a ferulaldehid főként az antioxidáns vagy a jelátvitelre gyakorolt hatásán keresztül gátolja-e a MAP kinázok és az NF- κ B aktivációját, és az iNOS-t kódoló gén expresszióját. Valamint, hogy az Akt1 és a Gsk-3 β foszforilációján keresztül hat-e CypD fehérje foszforilációjára, és a mitokondrium belső pórusainak a nyílására.

Az irodalomban olvashatjuk, hogy a CypD PI3K/Akt2 útvonalon történő foszforilációjának gátlásával kiváltható a rákos sejtek halála. Valamint a PARP fehérjék aktivációja a PI3K/Akt1 útvonalon kiváltják a gyulladás során az mPTP nyílását, és fokozza a gyulladásos gének átírását, ugyanakkor fokozott aktivációja kiváltja a sejthalált.

7. Ezeknek ismeretében célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, azt hogy IK11 kezelése kiváltja-e a rákos HepG2 máj sejtek mitokondriumainak mPTP nyílását jelző depolarizációját, ROS termelését és végül a sejtek apoptózisát valamint nekrozisát. Ugyanakkor azt is meg akartuk tudni, hogy a PARP aktivációja az IK11 kezelést követően a sejthalál kialakításában mekkora mértékben vesz részt. Valamint, hogy a PARP aktivációjának a gátlása milyen jelátviteli folyamatokon keresztül gátolja a sejthalált, valamint a sejthalált a mitokondriális pórusnyílás gátlásán keresztül szabályozza-e.

Anyag és módszer

Reagensok

Minden vegyszert, sejttenyésztő oldatot, az *Escherichia coli* lipopoliszacharidot (LPS) (0127: B8), a proteáz és foszfatáz inhibitor koktél, a calcein-acetomethoxy (AM) származékot, A23187 kalcium ionofórt, a dihidrorodamin 123 fluoreszcens festéket és a peroxidáz enzimmel összekapcsolt anti-egér IgG másodlagos antitestet a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) cégtől vásároltuk. A torma peroxidáz konjugált anti-nyúl IgG szekunder antitestet, az anti-foszfo-forkhead box O (FOXO)-1 és FOXO-3a elsődleges antitesteket a BIO-RAD Magyarország Ltd. vállalattól rendeltük (Budapest, Magyarország). Az elsődleges anti-foszfo-Akt1 (Ser473), az anti-foszfo-NF- κ B p65 (Ser536), anti-foszfo-44/42-MAPK (Thr202/Tyr204), anti-foszfo-p38-MAPK (Thr180/Tyr182), anti-foszfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) a Cell Signalling Technology (Danvers, MA, USA) társaságtól vásároltuk. A HepG2 sejteknél használt anti-foszfo-JNK (Thr183/Tyr185) antitestet az R&D cégtől rendeltük. Az MKP-1 (C-19) elsődleges antitestet a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) társaságtól vásároltuk. Anti-gliceraldehid 3-foszfát-dehidrogenázt (GAPDH) és anti-hisztin H1 primer antitesteket a Millipore Merck Ltd. (Budapest, Magyarország) és az Abcam vállalattól (Cambridge, Egyesült Királyság) rendeltük. A Co (II) klorid-6-hidrátot a Reanal (Budapest, Magyarország), a 5,5',6,6'-tetraklór-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarboxyanine jodidot (JC-1), és 5-(és-6)-karboxi-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein-diacetátot (C-400) a Molecular Probes cégtől (Csertex Kft, Budapest, Magyarország) vásároltuk. Az LY294002 a PI3K, az Akt gátlószer IV az Akt és az SP600125 a JNK aktivációjának gátlószere. Ezeket a termékeket a Calbiochem cégtől vásároltuk. A PJ34 PARP gátlószert és a transz-rezveratrolt a Sigma-Aldrich cégtől vettük. Az IK11-et mi szintetizáltuk (296) és dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk fel, miközben ezerszeresére hígítottuk. A HO3089 (297) és a L2286 (298) PARP gátlókat és a ferulaldehidet professzor Hideg Kálmán professzor úrtól kaptuk (PTE ÁOK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet, Magyarország, Pécs). Az *Escherichia coli* baktériumtól származó LPS-t (0127: B8) a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) cégtől rendeltük.

Egerek

A hím homozigóta Ppif $-/-$ cyclophilin D knock-out és a vad típusú C57BL/6 egereket Prof. Dr. Tretter Lászlótól kaptuk (Simmelweis Egyetem, Budapest, Magyarország). A CypD $-/-$ és a vad típusú C57BL/6 egereket sztenderdizált körülmények között az USNIH által megfogalmazott laboratóriumi állatok tartására és használatára vonatkozó szabályzatnak megfelelően tartottuk. Az egereknek tetszés szerint csapvizet adtunk. Emellett az egereknek kukoricát, árpát, búzát, tejport, süítő élesztőt, meszet és szóját tartalmazó tisztítatlan diétán tartottunk (Szindbád Ltd, Gödöllő). Állatkísérletek a helyi Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság szabályainak megfelelően történtek. Minden kísérleti eljárást a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának állatkísérleteket felülvizsgáló bizottsága jóváhagyott.

Sejtkultúrák

Elsődleges peritoneális makrofágokat a Zhang és a munkatársai (299) által leírt protokollnak megfelelően izoláltuk a CypD $-/-$ és vad típusú 16-20 hetes egerekből, melyek testsúlya 22-35 g között mozgott. Az izolálást követően a sejteket 6 vagy 96 lyukú sejttenyésztő lemezekre osztottuk el. A 96 lyukú lemezek minden lyukába 10^5 vagy 2×10^5 sejt jutott. A 6 lyukú lemez esetében 80%-os volt a lefedettség. A másodlagos RAW264,7 egér makrofág sejtvonal (ECACC, Salisbury, UK) esetében a sejteket szintén 6 vagy 96 lyukú

sejttenyésztő lemezeken osztottuk el. A 96 lyukú sejttenyésztő lemezek lyukaiban 2×10^4 sejt, míg a 6 lyukú esetében 2×10^6 RAW264,7 sejt volt. Mind a primer intraperitoneális makrofágokat, mind a RAW264,7 sejteket endotoxinra tesztelt DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tenyésztő oldatban tartottuk, amely tartalmazott még 8 mM koncentrációban L-glutamin, 10%-ban magzati borjú szérumot és az intraperitoneális makrofágok esetében még 0,1 %-ban penicillin-sztreptomocint is. A termosztát 5% CO₂ és 37°C értékekre lett beállítva.

HepG2 humán máj daganatos sejt vonalat, melyet az European Collection of Cell Cultures cégtől vettünk, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) médiumban tartottunk fel, mely 10%-ban tartalmazott magzati borjú szérumot. A termosztát 5% CO₂ és 37°C értékekre lett beállítva. Az életképességi vizsgálatnál a 96 lyukú sejttenyésztő lemezek lyukaiban 2×10^4 , míg a ROS mérés esetén 2×10^6 sejt volt.

A PARP elcsendesítése siRNS technikával

A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) reakciót katalizáló fehérjék elcsendesítésére használt siRNS-t egy céggel terveztettük meg (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). A HepG2 sejteket siRNS-t tranziensen Lipofektaminnal 2000-el transzfektáltuk egy meghatározott médiumban (Opti-MEM I Reduced Serum Medium), melyet az Invitrogen cégtől rendeltünk. Ahhoz, hogy biztosítsuk a PARP fehérjék siRNS történő gátlását, 48 óránként háromszor transzfektáltuk a HepG2 sejteket siRNS-el. Valamint az utolsó transzfekciót követően, 40 óra múlva végeztük el a kísérletet.

Immunoblot

A 80%-os lefedettségű CypD -/- és vad típusú peritoneális makrofág sejteket a 6 lyukú sejttenyésztő lemezeken 1 µg/ml LPS-el kezeltük 90 percig. Ezt követően egyszer átmostuk pufferrel (PBS), és ultrahang segítségével feltártuk 100 µl oldatban (50 mM 4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-etán-szulfonsav (HEPES), 150 mM NaCl, 1 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), 2,5 mM etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA), 0,1% polioxietilén (20) szorbitán-monolaurát (Tween-20), 10% glicerin, 0,1 mM Na₃VO₄, 10 mM 1, 4-ditiotreitol (DTT), proteáz és foszfatáz inhibitor koktél). A minták fehérje tartalmát minden esetben egy erre a célra vásárolt készlet (DC™ Protein Assay Kit, Bio-Rad, Hercules, CA) segítségével határoztuk meg. Majd mindhárom sejtlyúzatumokhoz 2x Laemmli mintapuffert adtunk, a mintákat ezt követően 5 percig főztük és 17000 g-vel centrifugáltuk 5 percig, majd a felülúszót használtuk.

A RAW264,7 sejtek esetében 2×10^6 sejt volt 6 lyukú lemezek minden egyes lyukában. A RAW264,7 sejteket ebben az esetben 100 ng/ml LPS-el és/vagy 50 µM ferulaldehiddel kezeltük 10 vagy 30 percig, majd a sejteket jéghideg lízispufferben vettük fel, amely 0,5 mM nátrium-metavanadátot, 1 mM EDTA-t és a proteáz inhibitor koktélt tartalmazott PBS-ben feloldva.

A HepG2 sejteket ezerszeres hígításban DMSO-val (oldószeres kontroll) vagy az ezerszeres hígítású DMSO-ban feloldott 10 µM koncentrációjú IK11-el és/vagy 10 µM PJ34 PARP gátlóval kezeltük. A PARP gátlót 1 órával az IK11 kezelés előtt adtuk a sejtekhez, majd az IK11 kezelést követően 6 órán keresztül inkubáltuk. A HepG2 sejteket ezt követően feltártuk lízispufferben (0,5 mM nátrium-metavanadát, 1 mM EDTA, proteáz és foszfatáz gátló keverék PBS-ben feloldva). A RAW264,7 és HepG2 sejtek líziséét követően az oldatokban lévő fehérjéket triklór-ecetsavval kicsaptuk, majd háromszor átmoszuk -20 °C-os acetonnal. Az üledéket ezt követően felvettük 1x Laemmli mintapufferben.

Az intraperitoneális, a HepG2 és a RAW264,7 sejtek esetében 20 µg fehérjét tartalmazó minta oldatokat választottuk el 10%-os vagy 12%-os nátrium-dodecil-szulfát gélen és nitrocellulóz membránra vittük át. A membránokat blokkoltuk zsírintes tejpor 5%-os

oldatával 1 órán át szobahőmérsékleten, és ezt követően egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk a membrán csíkokat az elsődleges antitestek (1:1000) jelenlétében. Majd ezt követően szobahőmérsékleten 2 órán át inkubáltuk a membránokat a tormagyökér-peroxidáz enzimmel rendelkező másodlagos antitestek (1:5000) jelenlétében. A peroxidáz aktivitást ECL rendszer (AP Hungary Ltd, Budapest, Hungary) segítségével mutattuk ki, melyben a szubsztrát kemolumineszcens jelet bocsát ki, mely lehetővé teszi a sávok láthatóvá tételét röntgen filmen. A filmen a sávok intenzitását a digitalizálás után NIH ImageJ programmal mértük meg. A pixel sűrűséget minden esetben a (loading) kontrollhoz viszonyítva normalizáltuk. Mindegyik immunoblot kísérletet legalább három alkalommal ismételtük meg.

Az NF- κ B aktivációja

A sejtmag fehérje kivonatának elkészítése

A CypD $-/-$ és a vad típusú peritoneális makrofág sejteket ugyanúgy kezeltük, mint az immunoblot esetében. Ez követően a sejteket hipotóniás A pufferben vettük fel (10 mM 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav (HEPES), 10 mM KCl, 1 mM ditiotritol (DTT), 0,1 mM EDTA, és 0,5 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid, pH=7,6), majd 10 perc át jégben tartottuk, és 10 másodpercig rázattuk. A mintákat ezt követően 12000 g fordulaton 20 másodpercig centrifugáltuk. A centrifugálás után a sejtmag az üledékben, míg a sejtplazma fehérjéi a felülúszóban jelentek meg. Az üledékhez ezután C puffer oldatot (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 mM fenil-metil-fluorid, 25% glicerin, és 0,4 M NaCl, pH=7,6) adtunk, majd 30 percig jégen tartottuk, és ultrahang segítségével feltártuk. Ezt követően 12000 g fordulaton 20 percig centrifugáltuk, majd a sejtmag fehérjéit tartalmazó felülúszót – 70 °C-on tároltuk. Végül a felülúszókból immunoblot technikával meghatároztuk a hiszton H1 fehérje mennyiségét.

Az NF- κ B DNS kötődésének a vizsgálata

Miután az peritoneális makrofág sejteket felvettük A pufferben, 10 percen át jégen tartottuk, majd 12000 g fordulaton 20 másodpercig centrifugáltuk. Az üledékben lévő sejtmagot felvettük C puffer oldatban, és ezt követően szonikáltuk. Majd a 200 μ g sejtmag szuszpenziót 2 μ g biotinilált kettős szálú oligonukleotid jelenlétében inkubáltuk 30 percig 4°C vízfürdőben. Az oligonukleotidok (biotin- CCTTGAAGGGATTCCCTCC, Invitrogen) a rágcsálók NF- κ B fehérjét kötő konszenzus DNS szekvenciával rendelkeznek, melyekhez a transzkripciós faktorok kapcsolódtak. Ezután 30 μ l sztreptavidinnel bevont mágneses mikrogöngyöket (Sigma - Aldrich) adtunk a mintához, és az inkubálást még további 30 percig folytattuk. A göngyöket mágnes segítségével lehúztuk, és háromszor átmoszuk jéghideg PBS oldatban. Ezután 25 μ l merkaptóetanolt nem tartalmazó 2x Laemmli minta puffert adtunk a mintákhoz, később 5 percen át forraltuk és a mintákat immunoblot analízisnek vetettük alá (300). A felülúszóban lévő hiszton H1 fehérje mennyiségét használtuk viszonyítási alapként. Minden kísérletet háromszor ismételtük meg.

TNF- α mérés a hasüregi makrofág sejtek médiumában

A 6 lyukú lemezekben az 80% borítású CypD $-/-$ és vad típusú peritoneális makrofág sejteket 1 μ g/ml lipopoliszachariddal 90 percig kezeltük, majd TNF- α mennyiségét megmértük a médium felülúszójában Quantikine M TNF- α szendvics ELISA kit segítségével (R & D Systems, Abingdon, UK) a gyártó utasításai szerint. Ezeket a kísérleteket háromszor ismételtük meg.

A teljes sejt ROS termelésének meghatározása RAW264,7, HepG2 és a peritoneális makrofág sejtekben

A 96 lyukú tenyésztő lemez minden egyes lyukába 2×10^5 CypD $-/-$ és vad típusú intraperitoneális makrofágokat helyeztünk el. A médiumot másnap kicseréltük 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS-t tartalmazó vagy LPS-t nem tartalmazó friss médiumra. A RAW264,7 sejtek esetében a 96 lyukú lemez lyukanként 10^5 sejtet tartalmazott, és a sejteket 100 ng/ml lipopoliszachariddal (LPS) és/vagy 1-100 μM ferulaldehiddel (FA) vagy csak (100 μM) ferulaldehiddel kezeltük. A ferulaldehidet 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk a sejtek médiumába, és az LPS és/vagy FA kezelést követően 22 órán át termosztátban inkubáltuk a sejteket. Majd a sejtek médiumába 2,4 dichlorodihydrofluorescein-diacetátot (C-400) adtunk 2 mg/l-es végső koncentrációban, és további 2 órán át inkubáltuk. A fluoreszcenciát 485 nm gerjesztési és 555 nm emissziós hullámhosszon vizsgáltuk Glomax Multi+ (Promega, Mannheim, Németország) multimódú olvasóval. A peritoneális és a RAW makrofág sejtek esetében is három független kísérletet, és minden egyes kísérlet során 6 párhuzamos vizsgálatot végeztünk.

A HepG2 sejtek esetében a 96 lyukú tenyésztőlemez lyukaiba 2×10^6 sejtet helyeztünk, majd egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap a médiumot kicseréltük egy friss médiumra, és a sejteket ezerszeres hígításban DMSO-val (oldószeres kontroll) vagy ezerszeres hígítású DMSO-ban feloldott 0,1-10 μM koncentrációjú IK11-el és/vagy 10 μM koncentrációjú PJ34 PARP gátlóval vagy 2 mM koncentrációjú N-acetil-ciszteinnel (NAC) kezeltük 24 órán át. Az N-acetil-ciszteint 5 perccel, a PARP gátlót egy órával az IK11 kezelés előtt adtuk a sejtekhez, az siRNS-el pedig 40 órával az IK11 kezelést megelőzően három szakaszban transzfektáltuk a sejteket. A kezelések utolsó két órájában a médiumba 2 mg/l-es végső koncentrációban C400-at adtunk, majd 485 nm gerjesztési és 555 nm emissziós hullámhosszon Glomax Multi+ (Promega, Mannheim, Németország) multimódú olvasóval megmértük a C400 fluoreszcenciájának változását. A HepG2 sejtek esetében három független kísérletet végeztünk, és minden egyes kísérlet során 6 párhuzamos vizsgálatot végeztünk.

A HepG2 sejtek életképességi vizsgálata

A HepG2 sejtek esetében a 96 lyukú tenyésztőlemez lyukaiban 2×10^6 sejtet helyeztünk, majd egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap a médiumot kicseréltük egy friss médiumra, és a sejteket ezerszeres hígításban DMSO-val vagy ezerszeres hígítású DMSO-ban feloldott 0,1-10 μM koncentrációjú IK11-el és/vagy 2 mM NAC, 10 μM koncentrációjú PJ34 PARP gátlóval kezeltük 24 órán át. A PARP gátlót egy órával az IK11 kezelés előtt adtuk a sejtekhez. Emellett siRNS-el transzfektált HepG2 sejteket is kezeltük DMSO-ban feloldott 10 μM koncentrációjú IK11-el 24 órán át. A kezeléseket követően a médiumokat kicseréltük, friss MTT-t 0,5%-ban tartalmazó DMEM médiumra, és további három órán át inkubáltuk a sejteket. Majd a formazánná redukált MTT-t, 0,4%-ban HCl-t tartalmazó izopropanol segítségével detektáltuk. A nem vízdékony formazán festék koncentrációja alapján határoztuk meg az élő sejtek számát. Miután a vízben nem oldódó formazánt savanyított izopropanolban feloldottuk, megmértük az abszorpciót Anthos Labtech 2010 plate-reader segítségével 550 nm hullámhosszon. Három független kísérlet során hat párhuzamos mérést végeztünk.

A HepG2 sejteket ezerszeres hígításban DMSO-val (oldószeres kontroll) vagy ezerszeres hígítású DMSO-ban feloldott IK11-el (10 μM) és/vagy 10 μM koncentrációban SP-600125-el (JNK gátlószer), 32,54 μM koncentrációban LY294002-el (PI3K gátlószer), 5 μM koncentrációban Akt-gátlószer IV.-el (specifikus Akt gátlószer) és 50 μM koncentrációban rezveratrollal kezeltük 24 órán keresztül. A kezeléseket követően a médiumokat kicseréltük, friss MTT-t 0,5%-ban tartalmazó DMEM médiumra, és további három órán át inkubáltuk a sejteket. Majd a formazánná redukált MTT-t, 0,4%-ban HCl-t tartalmazó izopropanol

segítségével detektáltuk abszorpciót Anthos Labtech 2010 plate-reader segítségével 550 nm hullámhosszon. Három független kísérlet során hat párhuzamos mérést végeztünk.

Sejtciklus analízisa áramlási citométerrel

A HepG2 sejtek sejtciklusát úgy szinkronizáltuk, hogy szérumhiányos médiumba inkubáltuk a sejteket egy éjszakán át. Ezt követően a sejteket 24 órán át kezeltük vagy nem kezeltük 10 μM koncentrációban PJ34 PARP gátlóval vagy 10 μM koncentrációban IK11-el. A kezeléseket követően a sejteket 75%-os alkohollal fixáltuk és permeabilizáltuk. Majd átmostuk és festéket tartalmazó médiumban inkubáltuk (10 $\mu\text{g/ml}$ propidium-jodid és 100 $\mu\text{g/ml}$ RNáz A PBS-ben feloldva) 1 órán át 4 °C-on. A DNS tartalmat FACSCalibur áramlási citométerrel mértük meg. Az adatokat FCS Express Version 3 szoftverrel értékeltük ki. Majd a G1, S, G2+M fázisban lévő sejtek értékeit százalékban határoztuk meg. Három független kísérletet végeztünk.

Nitrit koncentráció meghatározása

A 96 lyukú tenyésztő lemez minden egyes lyukába 10^5 CypD $-/-$ és vad típusú intraperitoneális makrofágokat helyeztünk el, és egy éjszakán át inkubáltuk. A médiumot másnap kicseréltük 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS-t tartalmazó vagy LPS-t nem tartalmazó friss médiumra. A RAW264,7 sejtek esetében a 96 lyukú lemez lyukanként szintén 10^5 sejtet tartalmazott, de ebben az esetben 100 ng/ml lipopoliszacharidot (LPS) és/vagy 1-100 μM ferulaldehidet (FA) vagy csak 100 μM ferulaldehidet használtunk. A ferulaldehidet minden esetben 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk a médiumba. Az LPS és/vagy FA kezelést követően 24 órán át inkubáltuk a primer és szekunder sejt vonalakat. Ezt követően a nitrit termelést a médiumban határoztuk meg, úgy hogy a sejtek médiumának 50 mikroliteréhez 50 μl Griess reagenst adtunk (1% sulphanilamide, 0.1% naphthylethylenediamide in 5% phosphoric acid) és a fényelnyelést mértük 550 nm Glomax Multi+ multimódú olvasóval. A vizsgálat során legalább 6 párhuzamos kísérletet ismételtünk meg háromszor.

A mitokondriális ROS termelés meghatározása

A 96 lyukú tenyésztő lemez minden egyes lyukába 10^5 CypD $-/-$ és vad típusú peritoneális makrofágokat helyeztünk el, és egy éjszakán át inkubáltuk. A médiumot másnap kicseréltük 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS-t tartalmazó vagy LPS mentes friss médiumra, és 2, 10 és 22 órán át inkubáltuk. Majd a sejteket médiumába dihidrorodamin 123 adtunk 2 μM -os végső koncentrációban és további 2 órán át inkubáltuk. A fluoreszcenciát 485 nm gerjesztési és 520 nm emissziós hullámhosszon mértük Glomax Multi+ (Promega, Mannheim, Németország) multimódú olvasóval. A vizsgálat során legalább 6 párhuzamos kísérletet ismételtünk meg háromszor.

A mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi\text{m}$) meghatározása a HepG2, Raw264,7 és a peritoneális makrofág sejtekben

A 6 lyukú tenyésztő lemezek minden egyes lyuka 80%-os lefedettségben tartalmazott CypD $-/-$ és vad típusú peritoneális makrofágok sejteket. A médiumot másnap kicseréltük 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS-t tartalmazó vagy LPS mentes friss médiumra, és 90 percig inkubáltuk. Majd a sejteket enyhe tripszinezés mellett, PBS-ben mostuk, és inkubáltuk szobahőmérsékleten 2 μM JC-1 jelenlétében 5 percig, vagy 10 percig kezeltük 100 nmol/l koncentrációban feszültségfüggő tetrametil-rodamin-metil-észter (TMRM) fluoreszcens festékkel. A RAW264,7 sejteket eltérően a peritoneális makrofág sejtektől 5, 10, 30 vagy 60 percig kezeltük 100 ng/ml koncentrációban lipopoliszachariddal és/vagy 50 μM koncentrációjú ferulaldehiddel. A HepG2 sejteket ezerszeres hígításban DMSO-val (oldószeres kontroll) vagy az ezerszeres hígítású DMSO-ban feloldott 10 μM IK11-el kezeltük 30 percig. A

RAW264,7 és a HepG2 sejteket a kezelést követően kétszer (RAW264,7) vagy egyszer (HepG2) átmostuk hideg PBS oldattal, és 2 μM JC-1 fluoreszcens festékkel 15 percig (RAW264,7) vagy 5 percig (HepG2) 37 °C-on inkubáltuk. Majd a HepG2 sejtek esetében a sejteket átmostuk hideg PBS-ben. A JC-1 és TMRM festést követően a RAW264,7, a HepG2 és peritoneális makrofág sejteket BD FACS Calibur áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) vizsgáltuk. A JC-1 esetében a fluoreszcens festék felhalmozódik a mitokondriumban és feszültségfüggő módon jelzi a mitokondrium depolarizációját, miközben a kibocsátott fluoreszcens fény a vörösről ($\approx 590\text{nm}$) zöldre ($\approx 529\text{nm}$) vált. A mitokondrium depolarizációja során a piros/zöld fluoreszcencia intenzitások aránya csökken, miközben 488 nm hullámhosszúságú lézer fénnel gerjesztünk. A TMRM egy feszültségfüggő fluoreszcens festék, mely szintén jelzi a membránpotenciál változását. A TMRM esetében 543 nm hullámhosszúságú lézer fénnel gerjesztettünk, és a kibocsátott fluoreszcens fényt 585 nanométeren vizsgáltuk. Az adatokat a CELLQuest szoftvert (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) segítségével értékeltük ki. Minden kísérletet háromszor ismételtük meg. A 6 lyukú lemez lyukaiban a fedőlemezekben lévő RAW264,7 sejteket 100 ng/ml LPS és vagy 50 μM ferulaldehiddel (FA) kezeltük. A ferulaldehidet (50 μM) minden esetben 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk a sejtekhez. Az LPS kezelést követően fél órán át inkubáltuk a sejteket, majd a fedőlemezt a tárgylemezre helyeztük, úgy hogy a sejtek a két üveglap között helyezkedjenek el. Ezt követően 488 nm-en gerjesztettünk és a zöld és a piros fluoreszcens fényt ProgRes C12 Plus kamerával rendelkező Zeiss Axiovert 25 fluoreszcens mikroszkóppal rögzítettük, miközben 63x nagyítású objektívvel, és epifluoreszcens megvilágítással dolgoztunk. A fényképezésnél ugyanazon a területen fényképeztük le az emittált vörös és zöld fluoreszcens fényt, majd a két különböző színű képet egyesítettük. A kísérletet háromszor ismételtük meg.

RNS extrakció és kvantitatív reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (Q-RT-PCR)

A 6 lyukú lemez lyukaiban a fedőlemezekben lévő 2×10^6 RAW264,7 sejtet 100 ng/ml lipopoliszachariddal és/vagy 50 μM ferulaldehiddel (FA) kezeltük. A 50 μM ferulaldehidet minden esetben 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk a sejtekhez. Az LPS és/vagy ferulaldehid kezelés 10 vagy 30 percig tartott. Ezt követően a RAW264,7 sejtek teljes RNS tartalmát Trizol reagenssel vontuk ki (Sigma Aldrich Co., Budapest, Magyarország), amit a gyártó utasításainak megfelelően használtunk. Ezt követően 1 μg RNS-t Moloney egér leukémia vírus reverz transzkriptázt használva átírtuk cDNS-é (M-MuLV RT, RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit) (Fermentas, Burlington, Ontario, Kanada) 1 órán át tartó 42 °C-os inkubáció során 20 μl -es végső térfogatú oldatban. Ezt követően 1 μl cDNS-t használtunk a valós idejű PCR méréshez, melyhez Corbett Rotor-gén 3000 PCR készüléket használtunk. A PCR reakció 45 cikluson keresztül zajlott, és minden egyes ciklus három szakaszból állt. Az első szakasz 95 °C-on 15 másodpercig, a második 55 °C-on 30 másodpercig és a harmadik 72 °C-on 45 másodpercig tartott. A három lépésből álló ciklust egy kezdő 95 °C-os 7 másodperces szakasz előzte meg, melyhez az iQ SYBR Green Supermix Kit-et használjuk (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A PCR-t az alábbi primerek alkalmazásával végeztük:

MKP-1Fwd 5'-TAACCACTTTGAGGGTCACTACC-3'

MKP-1Rev 5'-TTCACAACTCAAAGGCCTCG-3'

GAPDH Fwd 5'-ATTGTGGAAGGGCTCATGACC-3'

GAPDH Rev 5'-ATACTTGGCAGGTTTCTCCAGG-3'

A célgének relatív expressziójának statisztikai analizését a Ct érték alapján a Relative Expression Software Tool szoftver (Corbett Research, Germantown, MD, USA) segítségével

végeztük el, miközben a GAPDH háztartási génre normalizáltunk. Minden kísérletet háromszor ismételtünk meg.

A mitokondrium belső pórusnyílásának meghatározása

CypD $-/-$ és vad típusú peritoneális makrofágok sejteket úgy osztottuk szét a 6 lyukú tenyésztő lemezen, hogy minden egyes lyukba elhelyezett üveg fedőlemezre 10^6 sejt került, majd egy éjszakán át inkubáltuk a sejteket. Másnap a médiumot kicseréltük friss $1 \mu\text{g/ml}$ LPS-t tartalmazó médiumra, és további 30 vagy 60 percig inkubáltuk a sejteket. A médiumba az LPS inkubáció utolsó fél órájában $1 \mu\text{M}$ végső koncentrációba calcein-AM festéket adtunk. Majd a lemezeken lévő sejteket átmostuk Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionokat nem tartalmazó HBSS (Hank's balanced salt) oldattal. Ezután friss Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ion mentes HBSS oldatot adtunk minden egyes lyukba, amely 250 nM A23187 ionofórt, $90 \mu\text{M}$ Co(II)-kloridot, 1 g/L glükózt és $1 \mu\text{g/ml}$ LPS-t tartalmazott, és a sejteket ebben az oldatban 30 percig inkubáltuk. A fedőlemezeket ezt követően tárgylemezre helyeztük, úgy hogy a sejtek a két üveglap között helyezkedtek el, majd a fedőlemezek széleit szilikongéllal lezártuk. A sejteket egy SPOT RT3 CCD kamerával rendelkező Nikon Eclipse Ti fluoreszcens mikroszkóppal fényképeztük $40\times$ objektív nagyítás valamint vagy epifluoreszcens vagy fáziskontraszt megvilágítás mellett. Eredeti fáziskontraszt képeket fekete-fehér képekké alakítottunk át. A fluoreszcens és a fáziskontraszt képet azonos méretűre vágtuk és egymás mellé helyeztük. Ezeket a kísérleteket háromszor ismételtük meg.

Statisztikai analízis

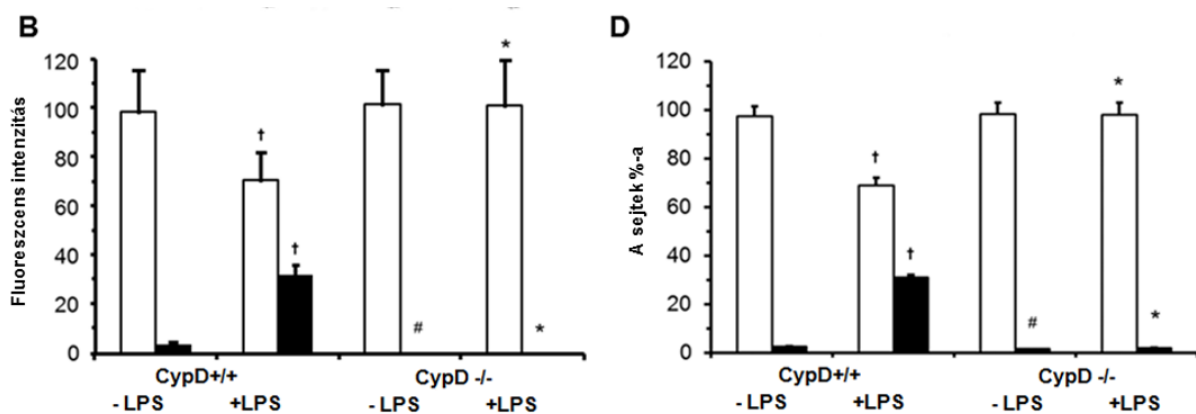
Az peritoneális makrofágok és a RAW264,7 sejtek esetében kapott átlag \pm SEM értékeket Tukey-féle post-hoc kétutas varianciaanalízissel határoztuk meg. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a $p < 0,05$.

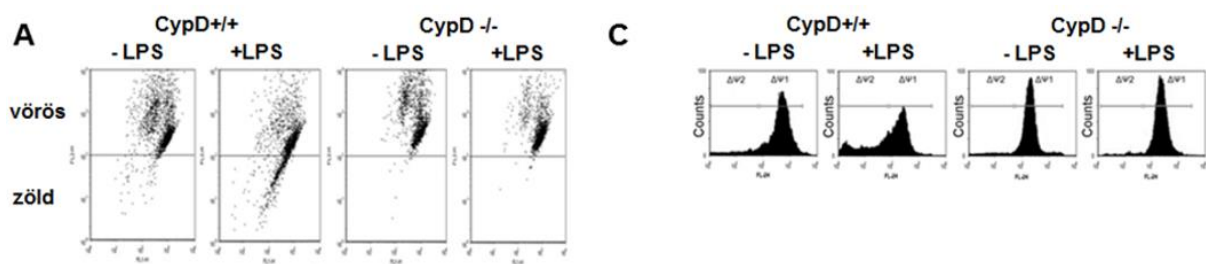
Eredmények

A CypD hiánya gátolta az LPS indukálta mitokondriális depolarizációt a peritoneális makrofágokban

A mitokondriális membrán depolarizációja gyakran megelőzi, de mindig jelen van a belső mitokondriális pórusok nyílásánál (166, 290, 291). Ezért olyan fontos, hogy a mitokondriális membránpotenciált meghatározzuk. Mi az LPS kezelést követően a peritoneális makrofág sejtekben a mitokondriális membránpotenciál változását TMRM és JC-1 festékek fluoreszcens intenzitásának változása alapján határoztuk meg. A fluoreszcencia változását áramlási citometriás mérés és fluoreszcens mikroszkóppal történtő fényképezés során vizsgáltuk. Emellett megnéztük azt is, hogy a CypD gén kiütése milyen hatással volt a sejtek mitokondriumainak a membránpotenciáljára az LPS kezelést követően. A JC-1 egy sejt-permeabilis, feszültségérzékeny mitokondriális fluoreszcens festék. Ha a mitokondriális membrán sértetlen és a membránpotenciál ($\Delta\Psi\text{m}$) normál értékű, a JC-1 monomerek a mitokondriumban aggregátumokat alkotnak, melyek vörösen fluoreszkáló fényt bocsátanak ki 488 nm -es gerjesztő fény használata mellett. Amikor a mitokondriumok depolarizált állapotban vannak, a vörös aggregátumok megszűnnek, és zöld fluoreszcens fényt kibocsátó JC-1 monomerek jelennek meg. Amikor a mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi\text{m}$) teljesen megszűnik, a vörös fluoreszcencia teljesen eltűnik. Amikor a mitokondriumot feszültségfüggő TMRM fluoreszcens festék festjük meg, a festék fluoreszcens intenzitása a depolarizáció során lecsökken. Kezdetben megvizsgáltuk, hogy a CypD fehérjének - a mitokondriális pórusnyílás elengedhetetlen szabályozójának - a hiánya hogyan hat az LPS indukálta mitokondriális depolarizációra. Ebben az esetben $1 \mu\text{g/ml}$ koncentrációban alkalmazott LPS

jelenlétében 90 percen át inkubáltuk a sejteket. Majd JC-1 (18. ábra A, B) vagy TMRM (18. ábra C, D) fluoreszcens festékekkel feltöltöttük a sejtek mitokondriumait, és a fluoreszcens intenzitás változását áramlási citométerrel mértük meg. A JC-1 festést követően látható volt, hogy az LPS kezelés (+LPS) depolarizálta a vad (CypD+/+) típusú peritoneális makrofágok mitokondriumainak membránját a vad típusú kontroll (-LPS) sejtekhez képest, így megjelentek a zöld JC-1 monomerek, ami jól látható a dot-plot ábrán (18. A ábra), valamint az oszlopdiaagramon is (18. B ábra). A dot-plot ábrán a függőleges tengelyen az FL1-H jelzésű mezőben vannak a zöld, míg a FL2-H mezőben pedig a vörös fluoreszcens intenzitású mitokondriumokat tartalmazó sejteket ábrázoló pontok (A). A CypD hiánya (CypD-/-) 90 perccel az LPS (+LPS) kezelést követően teljes mértékben meggátolta a mitokondriális membrán depolarizációját, és a membránpotenciált a kontroll, LPS-el nem kezelt sejteken mért értéken tartotta (18. A és B ábra). A dot-plot ábrán (18. A ábra) és az oszlopdiaagramon (18. B ábra) is jól látszik, hogy a kontroll (-LPS) sejtek esetében a CypD hiánya (CypD -/-) pozitívabb értéken tartotta a mitokondrium membrán potenciálját, mint ahogy azt a vad típusú (CypD +/+) kontroll (-LPS) sejtek esetében láttuk. A vizsgálatot megismételtük feszültségfüggő TMRM fluoreszcens festékekkel, amit szintén áramlási citometriás vizsgálat követett. Azt tapasztaltuk, hogy az LPS-el kezelt vad (CypD+/+) sejtek depolarizációja során a TMRM festék fluoreszcens fényének intenzitása lecsökkent, amit egyrészt a nagy membránpotenciálú $\Delta\Psi_m1$ mezőben a lecsökkent, valamint az alacsony membránpotenciált jelző $\Delta\Psi_m2$ mezőben a megnövekedett jel intenzitása mutatott (18. C ábra). Ugyanakkor az is látszik, hogy az LPS-el nem kezelt CypD -/- sejtek membránpotenciálja pozitívabb volt, mint azt az LPS-el nem kezelt vad típusú (CypD +/+) sejtek esetében láttuk. Valamint azt is, hogy az LPS kezelés nem módosította a CypD-/-sejtek membránpotenciáljának értékét 90 perccel az LPS kezelést követően (18. C ábra). A TMRM fluoreszcens festést követően a depolarizált és a nem depolarizált mitokondriumokkal rendelkező sejtek százalékos eloszlását oszlopdiaagramon is ábrázoltuk (18. D ábra). Az oszlopdiaagramon is jól látszik, hogy a vad típusú (CypD+/+) sejtek mitokondriumai az LPS kezelés hatására szignifikánsan depolarizálódtak (19. D ábra). Ugyanakkor a CypD -/- sejtek mitokondriumaik membránpotenciálja nem változott az LPS kezelés hatására, a vad típusú és a CypD hiányos LPS-el nem kezelt sejtekhez képest sem (18. D ábra). Az eredmények jól mutatják, hogy a CypD hiánya 90 perccel az LPS kezelést követően a mitokondrium belső membránjában a pórusnyílás gátlásán keresztül megakadályozta a mitokondriális membrán depolarizációját, valamint az LPS-el nem kezelt CypD hiányos sejtekben is gátolta a membrán kismértékű depolarizációját.



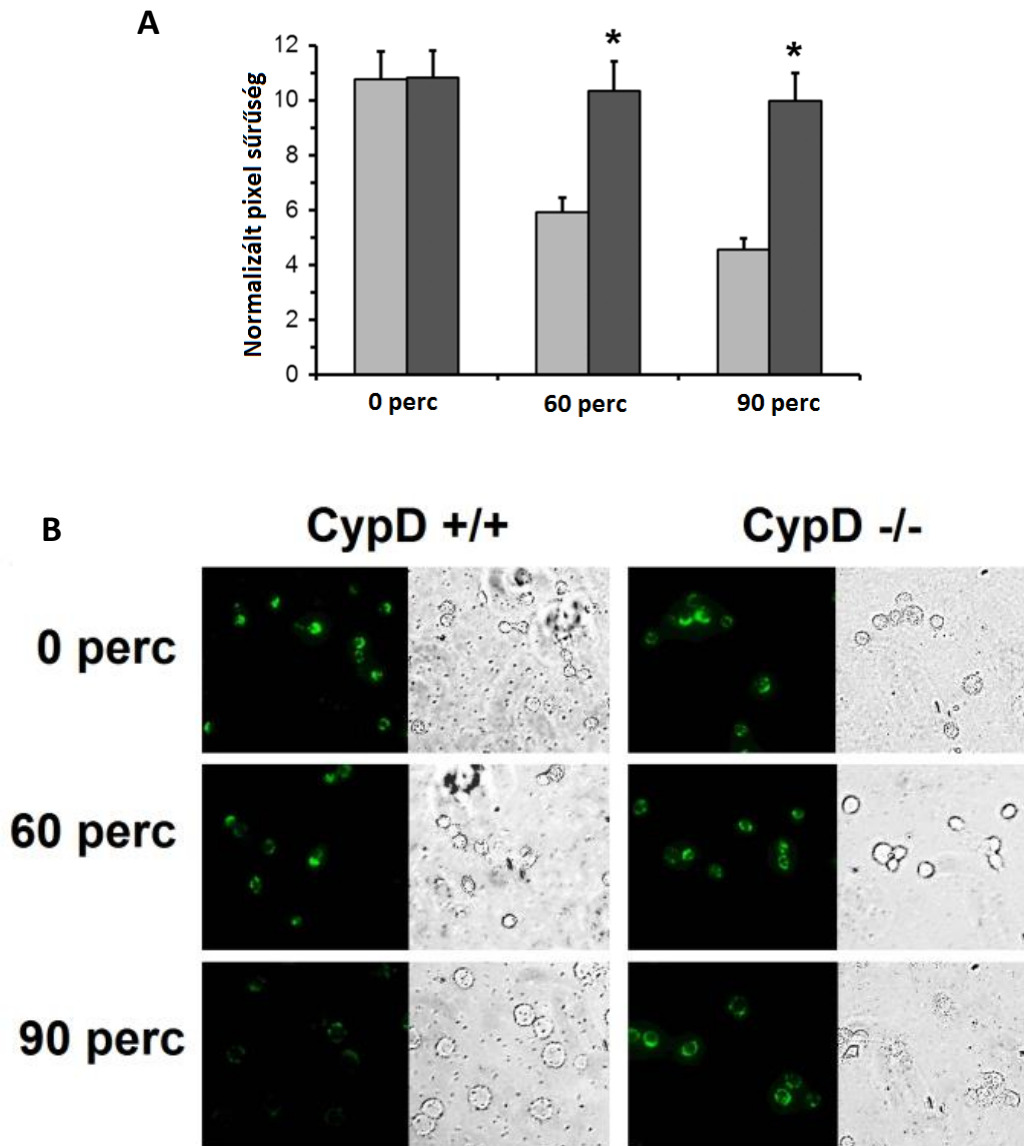


18. ábra A CypD hiánya gátolta az LPS indukálta mitokondriális depolarizációt a peritoneális makrofágokban. A vad-típusú (CypD^{+/+}) és a CypD hiányos (CypD^{-/-}) peritoneális makrofágokat vagy kezeltünk (+ LPS), vagy nem kezeltük (-LPS) lipopoliszachariddal. A 90 percig tartó (1 µg/ml) LPS-el kezelést követően a sejteket (2 µM) JC-1 (A és B) vagy (100 nM) TMRM fluoreszcens festékkel festettük (C és D), és a kibocsájtott fluoreszcens fény intenzitásának változását áramlási citométerrel mértük meg. A JC-1 használatakor 488 nm, míg a TMRM esetében 543 nm hullámhosszú gerjesztő lézer fényt használunk. A JC-1 fluoreszcens emissziója (A és B) a vörös intenzitású (≈590 nm) fénytől a zöld felé tolódott (≈529 nm), míg a TMRM esetében az 585 nm-en mért fluoreszcens emissziója csökkent a depolarizáció során (C és D). A JC-1 áramlási citometriás vizsgálat során kapott értékeket megjelenítettük dot-plot ábrán is (A) és az átlag ± SEM értékeket oszlopdiagramon (B). A TMRM fluoreszcencia intenzitásának értékeit megjelenítettük az intenzitások eloszlása alapján (C), valamint oszlopdiagramon (D). Utóbbi esetben a különböző fluoreszcens intenzitású sejtek százalékos eloszlásának átlag ± SEM értékeit ábrázoltuk (D). Az oszlopdiagramokon a vörös fluoreszcenciájú (B), vagy nagy membránpotenciálú (D) mitokondriumokkal rendelkező sejteket az üres oszlopok, míg a zöld (B) fluoreszcenciájú vagy alacsony membránpotenciálú mitokondriumokat a kitöltött oszlopok mutatják. Minden kísérletet háromszor ismételtünk meg. A szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) az -LPS (†), a CypD^{+/+} -LPS (#) és a CypD^{+/+} + LPS (*) csoportok értékeihez viszonyítva kaptunk meg. Minden kísérletet háromszor ismételtünk meg.

A CypD hiánya gátolta a mitokondrium belső pórusainak a nyílását az LPS-el kezelt peritoneális makrofágokban

A CypD fehérje szabályozza a belső és közvetve a külső pórusok nyílását (166, 173, 178, 184, 185, 291, 301). A belső pórusok nyílása, pedig a membránpotenciál csökkenését okozza (166, 290, 291). Ebből adódóan megvizsgáltuk, hogy az LPS biztosan kiváltja-e a mitokondrium belső pórusnyílását. A DMEM médiumban tartott vad (CypD^{+/+}) és a CypD hiányos (CypD^{-/-}) sejteket 1 µg/ml koncentrációban kezeltük LPS-el 1 vagy 1,5 órán át. Az LPS kezelés utolsó 30 percében a peritoneális makrofág sejtek médiumába calcein-AM nem fluoreszcens festéket adtunk 1 µM-os végső koncentrációban. Majd a DMEM médiumot kicseréltük HBSS médiumra, mely A23187 kalcium ionofórt, Co^{2+} -ionokat és (1 µg/ml) LPS-t tartalmazott. Ebben az oldatban a sejteket további 30 percig inkubáltuk. A calcein-AM áthatolt a sejt membránjain, és ennek köszönhetően, megjelent a citoszolban valamint a mitokondriumban is. Mindkét helyen nem specifikus észterázok lehasították az Am csoportokat, ennek köszönhetően a calceinek epifluoreszcens fényel gerjeszhető fluoreszcens festékké alakultak át, és zöld fluoreszcens fényt bocsátott ki. Az A23187 elősegíti a Co^{2+} -ionok felvételét a citoszolba (302), ahol kioltja a calcein fluoreszcenciáját. Azonban Co^{2+} -ionok a mitokondriumnak csak a külső membránjában lévő VDAC fehérjéin keresztül tudnak mozogni, de a mitokondrium belső membránban lévő Ca^{2+} -uniportereken nem, így a mitokondriumban a calcein zöld fluoreszcenciáját nem tudják kioltani. Amikor a belső pórusok kinyílnak Co^{2+} -ionok bejutnak a mitokondriumba, és kioltják a mitokondriumban lévő calceinek fluoreszcenciáját (303). A vad típusú (CypD^{+/+}) és a CypD^{-/-} lipopoliszachariddal nem kezelt kontroll sejtek (0 perc) esetében nem volt különbség sem a makrofágoknak sem morfológiájában, sem a makrofágok mitokondriumainak fluoreszcens intenzitásában. A CypD^{+/+} peritoneális makrofágok mitokondriumainak belső pórusai 60 és a 90 perccel az LPS kezelést követően egyre nagyobb számban nyíltak ki, miközben a

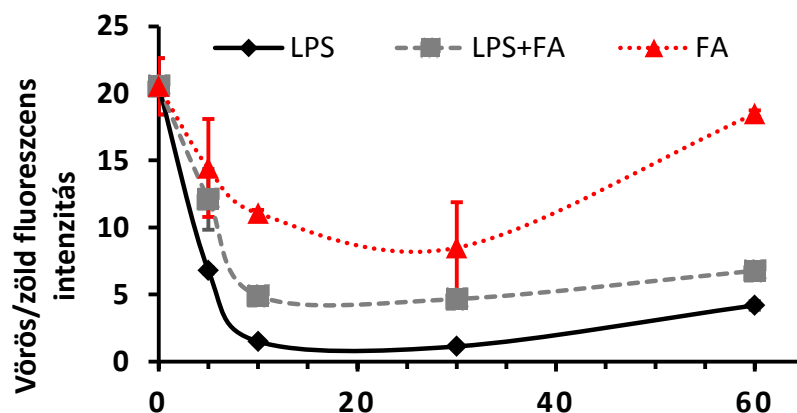
makrofágok morfológiája is megváltozott, utalva az aktiválásukra (19. A és B ábra). Ugyanakkor a CypD $-/-$ sejteknek sem a megjelenése, sem a mitokondriumok fluoreszcenciájának az intenzitása nem változott 60 és a 90 perccel az LPS kezelést követően (19. A és B ábra). A színes fluoreszcens képek és a hozzájuk tartozó fekete-fehér fáziskontraszt képeken található sejtek jól mutatják, hogy minden egyes makrofág sejt festődött. A fenti eredmények alapján egyértelműen kijelenthetjük, hogy az LPS kiváltja a mitokondrium belső pórusának nyílását és a CypD hiánya gátolja a lipopoliszacharid pórust nyitó hatását.



19. ábra A CypD hiánya gátolta a mitokondrium belső pórusainak a nyílását a lipopoliszachariddal kezelt peritoneális makrofágokban. A vad (CypD+/+) és a CypD $-/-$ sejteket (1 μ g/ml) LPS-el kezeltük 1 vagy 1,5 órán át. Majd a sejtekben a mitokondriumot megfestettük epifluoreszcens calcein festékkel. A calcein fluoreszcenciáját a citoszolban kioltottuk Co^{2+} -ionokkal. Ezt követően a sejtekben a mitokondriumok fluoreszcens intenzitásának a változását (színes képek) és fáziskontraszt képét (fekete-fehér képek) egy SPOT RT3 CCD kamerával rendelkező Nikon Eclipse Ti fluoreszcens mikroszkóppal fényképeztük 40 \times objektív nagyítás mellett. Az eredeti fáziskontraszt képeket alakítottunk fekete-fehér képekké (B). A kapott az átlag \pm SEM értékeket megjelenítettük oszlopdiagramon is (A), ahol a fluoreszcens intenzitás értékeket 100 sejtre normalizáltuk (A). A világos oszlopok a vad típusú, a sötét oszlopok a CypD hiányos peritoneális makrofágok sejtéknél kapott értékeket mutatják. A kísérletet háromszor ismételtük meg. A szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) minden esetben a megfelelő vad típusú sejtekhez viszonyítva kaptuk meg, amelyeket csillaggal jelöltünk (*).

A ferulaldehid gátolta az LPS indukálta mitokondriális depolarizációt a RAW264,7 sejtekben

A későbbiekben a RAW264,7 sejtekben is megnéztük, hogy a belső pórusok nyílást jelző mitokondriális depolarizáció az LPS kezelést követően mikor jelenik meg (20). Ekkor számukra már ismert tény volt, hogy az LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) kezelést követően a mitokondriumok pórusnyílása a calcein és kobalt ionokkal történő festést követően 90 perccel már szemmel is jól látható mértékben jelent meg. Így kíváncsiak voltunk, hogy a belső pórusnyílás szabályozta mitokondriális depolarizáció az LPS kezelést követően mikor jelenik meg. A Tucsek Zsuzsanna cikkében bemutatott kísérleteink során a RAW264,7 sejteket (100ng/ml) LPS-el és/vagy ferulaldehiddel (50 μM) kezeltük 5, 10, 30 vagy 60 percig. A ferulaldehidet minden esetben 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk a sejtekhez. Majd az LPS jelenlétében történő inkubációt követően (2 μM) JC-1 festékekkel kezeltük a sejteket, és a fluoreszcens intenzitását áramlási citométerrel mértük meg. Majd meghatároztuk a vörös és zöld intenzitású fluoreszcens emisszió arányát (20. A ábra). A kapott eredmények azt mutatták, hogy a RAW264,7 sejtek mitokondriumainak membránja a kis dózisu LPS kezelést követően már az ötödik percben szignifikánsan depolarizálódott, és a 10. percben a membránpotenciál csökkenése elérte maximális értékét, majd a 60. percben ismét növekedésnek indult (20. ábra). Ez utóbbi talán abból adódhatott, hogy itt már megtörtént a kis koncentrációban alkalmazott LPS fagolizozómákban történő feldolgozása, így azok az LPS jelátviteli folyamatok, amelyek a CypD pórusnyílást kiváltó foszforilációját okozták csökkenésnek indultak (274-276). A vizsgálat másik célja volt, hogy megtudjuk, vajon a ferulaldehid, mely a rezveratrollal azonos szerkezeti elemekkel is rendelkezik, vajon a rezveratrolhoz hasonlóan a CypD fehérjére gyakorolt hatásán keresztül gátolja-e a mitokondrium belső pórusának nyílását, és így a mitokondrium depolarizációját. Tucsek Zsuzsanna cikkében található eredmény jól mutatja (20. ábra), hogy annak ellenére, hogy a ferulaldehid önmagában is kiváltott a mitokondrium depolarizációját az első 30 percben, minden időpontban csökkentette az LPS mitokondrium belső membránjainak pórust nyitó, depolarizáló hatását (210). Az eredmények alapján tehát megállapíthatjuk, hogy a belső pórusok nyílását jelző mitokondriális depolarizáció gátlásával a polifenolok közé tartozó ferulaldehidnek még egy további közös tulajdonsága van - a szerkezetiileg azonos építőelemmel rendelkező mitokondrium belső pórusainak nyílását gátló, és az ATP hiányt csökkentő - transz-rezveratrollal (245, 304, 305, 306, 307). Valamint azt is, hogy a mitokondrium membránjának szinte teljes depolarizációja megelőzi, a belső pórusok nagyszámú nyílását. Tehát a mitokondrium teljes depolarizációhoz nincsen szükség az összes pórus kinyílására.

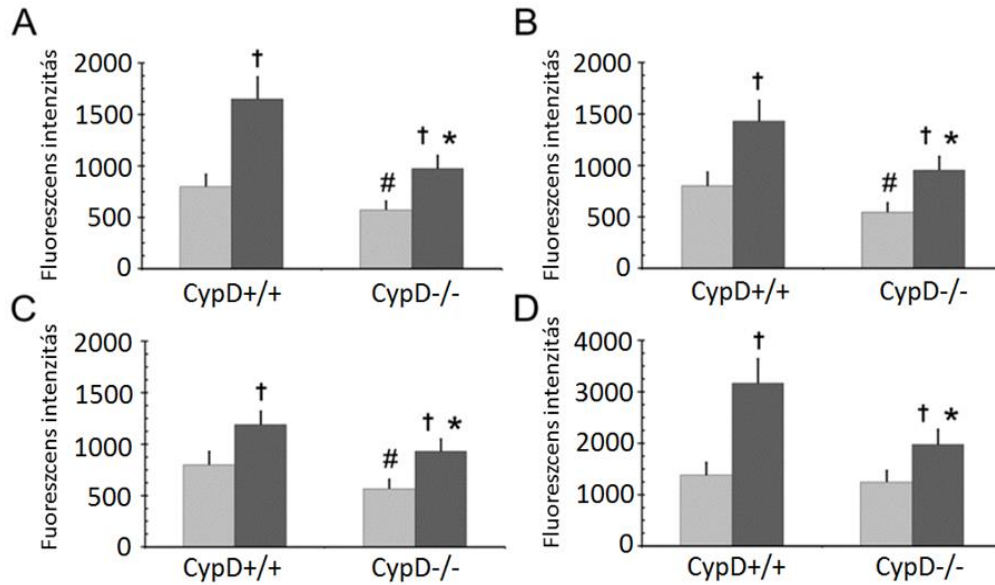


20. ábra A ferulaldehid gátolta az LPS indukálta mitokondriális depolarizációt RAW264,7 sejtekben. A RAW264,7 makrofág sejteket 5, 10, 30 vagy 60 percig kezeltük (100 ng/ml) LPS-el és/vagy (50 μM) ferulaldehiddel, majd JC-1 fluoreszcens festékekkel az áramlási citometriás vizsgálat során meghatároztuk a vörös

és zöld fény intenzitásának arányát (A). Az átlag \pm SEM értékek három független kísérletből származnak. Minden kísérletet háromszor ismételtünk meg.

A CypD hiánya gátolta az LPS indukálta ROS termelést a peritoneális makrofágokban és a tüdőben

A makrofágok által termelt reaktív oxigén és nitrogén fajták feladata a mikroorganizmusoknak és toxinjaiknak a károsítása (308). A fenti vizsgálatok során kimutattuk, hogy a CypD fehérje szabályozza az LPS stimulusra megjelenő belső pórusok nyílását, és ennek köszönhetően a mitokondrium depolarizációját. A mitokondrium belső pórusainak nyílása és a mitokondrium depolarizációja pedig együtt jár a mitokondrium fokozott ROS termelésével (196, 197). Az irodalom a reaktív oxigén fajták fő forrásának a mitokondriumot, illetve a mitokondrium NADH dehidrogenázról leváló elektronokat tartja (197, 206). Ugyanakkor egy cikkben azt is olvashatjuk, hogy az LPS az ECSIT fehérje ubiquitinációján keresztül is ki tudja váltani a mitokondrium I-es komplexéről az elektronok leválását, és a szuperoxid gyökök megjelenését (211, 228). Emiatt mi megvizsgáltuk, hogy a CypD fehérjének a hiánya milyen mértékben szabályozza a mitokondriumok ROS termelését. Valamint a mitokondrium ROS termelése miképpen hat az egész sejt ROS termelésére. A vizsgálatunk során két különböző redox érzékeny (dihidrorodamin 123, C400) fluoreszcens festéket használtunk. A mitokondrium ROS termelését a dihidrorodamin 123 festékekkel vizsgáltuk az LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) kezelést követően 4 (21. A ábra), 12 (21. B ábra) és 24 (21. C ábra) óra múlva. A dihidrorodamin 123 még nem fluoreszcens, és könnyen átjut a sejt membránjain. Így bejut a citoszolba és a mitokondriumba is. A mitokondriumban található szuperoxid-dizmutáz hatására (SOD2) a dihidrorodamin123 rodamin123 fluoreszcens festékké alakul át (309). Ennek köszönhetően a rodamin123 csak a mitokondriális hálózatot festi meg. A vizsgálatok során azt találtuk, hogy a CypD hiánya az LPS-el kezelt (sötét oszlop) sejtekben szignifikánsan lecsökkentette a mitokondriális ROS termelést az LPS-el kezelt (sötét oszlop) vad típusú sejtekhez képest (21. A, B és C ábra). Ugyanakkor az LPS-el nem kezelt (világos oszlop) CypD^{-/-} sejtek esetében is ugyanezt láttuk az LPS-el nem kezelt (sötét oszlop) vad (CypD^{+/+}) sejtekhez képest (21. A, B és C ábra). Emellett az LPS kezelés során az is látható volt, hogy míg a CypD^{-/-} sejtekben a mitokondrium megemelkedett ROS termelése minden időpontban egy azonos alacsony értéken maradt, addig a vad (CypD^{+/+}) sejtekben az LPS kezelést követően a 4. órában volt a legnagyobb a mitokondriális ROS termelés, és a 24. órában volt a legkisebb. De ez utóbbi még mindig szignifikánsan magasabb értéken volt, mint ahogy azt az LPS-el kezelt CypD^{-/-} sejteknél láttuk ugyanebben az időpontban (21. A, B és C ábra). A mitokondrium ROS termelése mellett megvizsgáltuk, hogy a CypD hiánya, milyen mértékben hat a teljes sejt ROS termelésére C400 redox szenzitív festékekkel az LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) kezelést követően a 24. órában (21. D ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a CypD hiánya az LPS-el nem kezelt sejtek esetén (világos oszlopok) a vad típusú sejtekhez képest (sötét oszlopok) láthatóan nem volt hatással a teljes sejt ROS termelésére. Ugyanakkor, az LPS kezelt CypD^{-/-} sejtekben jelentős mértékben lecsökkentette a teljes sejtben a ROS termelést a vad típusú sejtekhez képest (21. ábra D). Így az eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a CypD hiánya az LPS kezelést követően szignifikánsan gátolta a ROS termelést, valamint egy állandó és stabil értéken tartotta a mitokondrium ROS termelését. Valamint ennek köszönhetően csak a mitokondrium ROS termelése biztosította a teljes sejt ROS termelését. Ugyanakkor azt is megállapíthatjuk, hogy a vad sejtekben az LPS kezelést követően a teljes sejt ROS termelését már nemcsak a mitokondrium biztosította. Hanem a mitokondrium ROS termelésének köszönhetően megjelent egy extramitokondriális ROS termelés is, valószínűleg a sérült enzimatikus reakcióknak köszönhetően.



21. ábra A CypD hiánya gátolta az LPS-indukálta ROS termelést a peritoneális makrofágokban. A vad típusú (CypD +/+) és CypD hiányos (CypD -/-) peritoneális makrofágokat kezeltük vagy nem kezeltük (1 µg/ml) LPS-el 4 (A), 12 (B) vagy 24 (C and D) órán át. Ugyanakkor (2 µM) dihidrorodamin 123 festékkel (A–C) a mitokondriumban, vagy (2 mg/l) C-400 (D) festékekkel a teljes sejtben meghatároztuk a ROS változását. Fluoreszcenciát 485 nm-en gerjesztettük, és 520 (A–C) vagy 555 (D) nm-en mértük az emittált fluoreszcens fény intenzitását. Az oszlopdiagramokon jelzett átlag ± SEM értékeket 3 független, 6 párhuzamossal rendelkező kísérlet során kaptuk. A szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) az -LPS (†), a CypD +/--LPS (#) vagy a CypD +/- + LPS (*) csoportokhoz viszonyítva kaptuk.

A ferulaldehid gátolta az LPS indukálta ROS termelést a RAW264,7 makrofág sejtekben

A korábbiakban már láttuk, hogy a RAW264,7 makrofág sejteknél használt ferulaldehid kismértékben, de szignifikánsan gátolta az lipopoliszacharid kiváltotta a belső mitokondriális pórusnyílást jelző depolarizációt. Ahogy már említettük, és a fenti eredményeink is mutatják, hogy a depolarizáció, a belső pórusnyílás és a mitokondrium ROS termelése egymástól el nem idegeníthető folyamatok. Így ferulaldehid esetében is megvizsgáltuk, hogy hogyan hat a sejt szintű ROS termelésre. A RAW264,7 makrofág sejteket 100 ng/ml koncentrációban lipopoliszachariddal és 1 µM, 25 µM, 50 µM vagy 100 µM koncentrációban ferulaldehiddel vagy csak ferulaldehiddel (100 µM) kezeltük 24 órán át (210). A ferulaldehidet minden esetben 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk a sejtekhez. A ROS termelést C400 redox érzékeny fluoreszcens festékkel határoztuk meg. A C400 fluoreszcens fényének intenzitása a festék oxidációjának mértékét mutatja, azaz a ROS szintjét jellemzi a teljes sejtben a 24 órás kezelést követően. Az eredményeken látható, hogy a (100 µM) ferulaldehid önmagában is csökkentette a ROS szintjét a lipopoliszachariddal nem kezelt sejtekben (22. A ábra). Ugyanakkor az is szembeütő, hogy a ferulaldehid koncentrációfüggő módon gátolta az LPS kezelést követően a ROS termelést a RAW264,7 szekunder makrofág sejt vonalban, és a ferulaldehid (50 µM) a kontroll érték alá csökkentette a teljes sejtben a ROS szintjét (22. A ábra). Mivel a ferulaldehid az LPS-el kezelt RAW264,7 sejtekben kisebb mértékben csökkentette a mitokondrium pórusnyílását jelző depolarizációját, és 1 µM-nál nagyobb koncentrációban a kontroll sejteknél mért érték alá csökkentette az LPS indukálta sejt szintű ROS termelést. Így elmondhatjuk, hogy a ferulaldehid nem a mitokondriális pórusnyílás és depolarizáció gátlásán keresztül fejtette ki hatását a teljes sejt ROS termelésére, hanem az oxidatív stressz gátlásán keresztül, azaz a szabadgyökfogó hatása érvényesült. Ugyanakkor a peritoneális sejteknél tapasztalt mitokondriumon kívüli ROS termelés sem indulhatott meg az

LPS-el kezelt sejtekben, mivel a sejtszintű ROS termelést az 1 μM -nál nagyobb koncentrációban alkalmazott ferulaldehid a kontroll érték alá csökkentette.

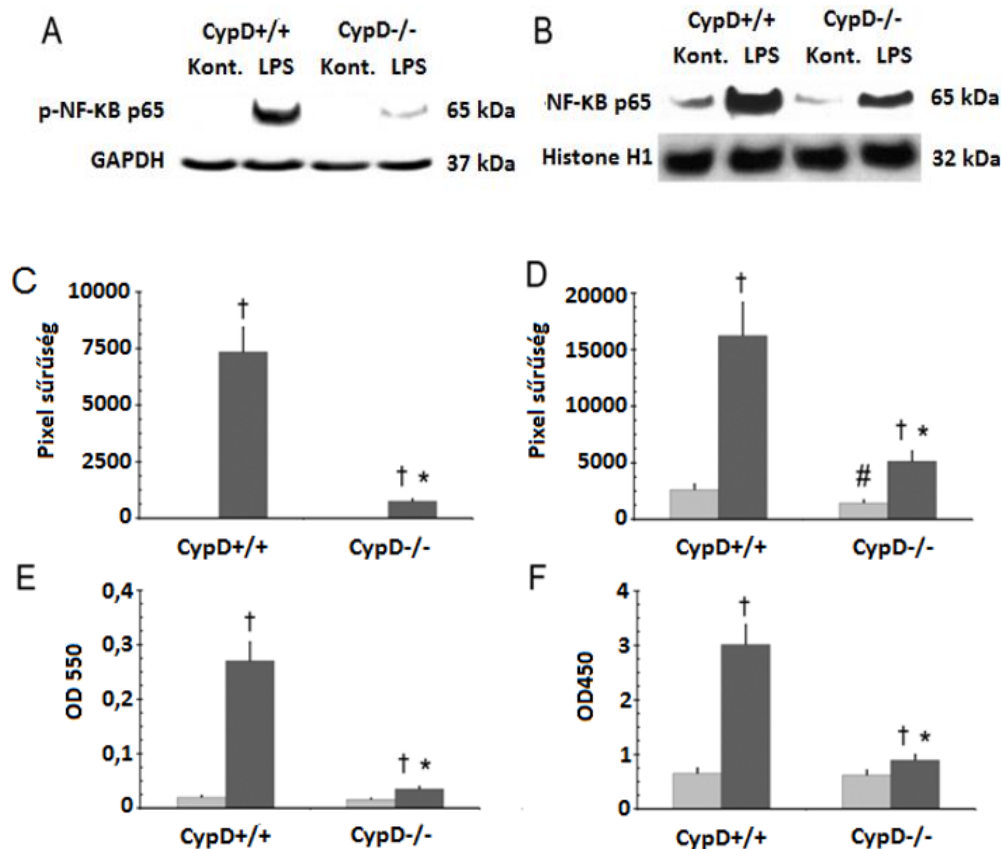
Fluoreszcens intenzitás	
Kontroll	365,33 \pm 9,52
LPS 100 ng/ml	1180 \pm 9,75
FA 1 μM + LPS 100 ng/ml	541,50 \pm 5,74
FA 25 μM + LPS 100 ng/ml	307,50 \pm 5,48
FA 50 μM + LPS 100 ng/ml	266,33 \pm 3,07
FA 75 μM + LPS 100 ng/ml	248,67 \pm 3,05
FA 100 μM + LPS 100 ng/ml	235.5 \pm 3,45
FA100 μM	162,00 \pm 1,29

22. ábra A ferulaldehid gátolta az LPS indukálta ROS termelést a RAW264,7 makrofág sejtekben. A RAW264,7 makrofág sejteket LPS-el és különböző koncentrációban ferulaldehiddel vagy csak ferulaldehiddel kezeltük 24 órán át. A ferulaldehidet minden esetben 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk a sejtekhez. A ROS termelését redox szenzitív C400 segítségével határoztuk meg. A festék redukált formája nem fluoreszcens, emiatt az oxidált alak fluoreszcencia intenzitása jelzi a ROS szintjét. Fluoreszcenciát 485 nm-en gerjesztettük, és 555 nm-en mértük. Az átlag \pm SEM értékeket három független 6 párhuzamossal rendelkező kísérlet során kaptunk.

A CypD hiánya gátolta az LPS indukálta NF- κ B aktivációt, az NF- κ B indukálta gének expresszióját a makrofág sejtekben

Az LPS jelátvitelénél a makrofágokban MyD88-függő és MyD88-független útvonalon egyaránt aktiválódik az NF- κ B transzkripciós faktor. Az NF- κ B p65 aktivációjához egyaránt szükség van a fehérje acetilációjára és foszforilációjára, hogy ki tudja fejteni transzkripciós aktivitását (112, 111, 310). Az NF- κ B aktivációját nemcsak a jelátviteli útvonalak biztosítják, hanem az oxidatív stressz is. Ugyanis, amikor az oxidatív stresszt a tüdőben N-acetil-cisztein (NAC) antioxidánsal gátolták, az szignifikánsan lecsökkentette az NF- κ B aktivációját (217). Ugyanezt látták akkor is, amikor a tüdőben a ROS termeléshez hozzájáró NADPH oxidáznak egyik alegységét kódoló génjét kiütötték (218). Az aktivált NF- κ B transzkripciós faktor számos gyulladást kialakító gén expresszióját váltja ki. Ezek közé a gének közé tartozik az iNOS, a TNF- α , az IL-1 β , az IL-6 és a COX-2 (108, 110, 112, 114). A fentiekből adódóan megvizsgáltuk, hogy a CypD hiánya, mely jelentősen gátolta a mitokondrium és a sejt ROS termelését, milyen mértékben gátolja a gyulladást kialakító NF- κ B p65 aktivációját a makrofágokban. Emellett megvizsgáltuk a makrofágok médiumában a TNF- α citokin szekréciójának mértékét, és az iNOS enzim aktivitását jelző nitrit szintet. Azaz megvizsgáltuk, hogy az LPS kezelést követően a mitokondriális ROS milyen mértékben járult hozzá az NF- κ B p65 aktivációjához, és sejtmagba helyeződéséhez, és az NF- κ B p65 indukált gének expressziójához. A vad típusú és CypD $^{-/-}$ peritoneális makrofág sejtek homogenizátumából 90 perccel az LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) kezelést követően immunblot technikával és egy foszforiláció specifikus (Ser536) elsődleges antitesttel meghatározzuk az NF- κ B p65 fehérje aktivációjának mértékét (23. A és C ábra). A kezeletlen vad és CypD $^{-/-}$ sejtekben az NF- κ B p65 foszforilációja a detektációs határ alatt volt (23. A és C ábra). Ugyanakkor az LPS kiváltotta p65 foszforilációját a vad típusú sejtekben, amit a CypD hiánya szignifikánsan le is csökkentett (23. A és C ábra). Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az NF- κ B 90 perccel az LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) kezelést követően mekkora mennyiségben vándorolt a sejtmagba a vad és a CypD $^{-/-}$ peritoneális sejtekben. A feltárt sejtmagban lévő p65 fehérjéhez biotinnal összekötött rácsáló NF- κ B fehérjét kötő DNS szekvenciát kapcsolunk (CCTTGAAGGGATTCCCTCC), utóbbiakat szterptavidinhez kapcsolt mágneses mikroyöngyökkel hoztuk össze és húztuk le. Végül immunbloton meghatároztuk az NF- κ B

mennyiségét primer antitestekkel. Az eredmények azt mutatták, hogy a CypD hiánya szignifikánsan lecsökkentette az aktivált NF- κ B p65 mennyiségét a lipopoliszachariddal kezelt és kezeletlen peritoneális makrofágok sejtmagjában (23. B és D ábra). Ezt követően megvizsgáltuk két NF- κ B-függő gén expresszióját is. Az egyik gén a TNF- α citokint (tumor necrosis factor α) a másik az LPS indukciójára megjelenő indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) fehérjét kódolta. A TNF- α szintjét 90 perccel az 1 μ g/ml-es LPS kezelést követően szendvics ELISA segítségével határoztuk meg a sejtek médiumából. Az iNOS által termelt nitrogén-monoxid szintjét pedig a NO eloxidálódott termékének a nitritnek a mennyiségéből indirekt módon határoztuk meg Griess reagenssel a sejtek médiumban (311). Mivel a nitrit 90 perccel az LPS kezelést követően nem volt kimutatható mennyiségben jelen, így a sejtek médiumában 24 órával az LPS kezelést követően mértük meg a felhalmozódott nitrit mennyiségét. A TNF- α (23. E ábra) és nitrit (23. F ábra) mennyisége az LPS kezelést követően jelentősen megnövekedett a vad típusú sejtek médiumában, miközben a CypD fehérjének a hiánya szignifikánsan lecsökkentette mindkettőjük szintjét (23. E és F ábra). A CypD fehérjének a hiánya az LPS kezelést követően a makrofágokban a ROS termelést, azonos mértékben gátolta, mint az NF- κ B p65 (se536) foszforilációját és sejtmagba helyeződését, valamint az NF- κ B transzkripciós faktor által szabályozott gének (iNOS, TNF- α) expresszióját.



23. ábra A CypD hiánya gátolta az LPS indukálta NF- κ B aktivációt, a TNF- α szekréciót és a nitrit felhalmozódását a peritoneális makrofág sejtekben. A vad típusú (CypD +/+) és a CypD hiányos (CypD -/-) peritoneális makrofág sejteket 90 percig (A és C) vagy 24 órán át (D) kezeltük (sötét oszlopok) vagy nem kezeltük (világos oszlopok) (1 μ g/ml) LPS-el. Majd az NF- κ B aktivációját meghatároztuk a sejtek homogenizátumából immunoblot eljárás során anti-foszfo-NF- κ B p65 (p-NF- κ B p65) elsődleges antitestekkel (A és C). Az NF- κ B aktivációját meghatároztuk a sejtmag fehérje kivonatából is az NF- κ B transzkripciós faktort kötő DNS szekvencia használatával is (B és D). Az immunoblottokon (A and B) bemutatott átlag \pm SEM értékeket a fehérjék szemikvantitatív jelenlétét mutató sávok pixel sűrűsége (C and D) alapján határoztuk meg 3 független kísérletben. A GAPDH (A and C) vagy a Histon H1 (B and D) fehérjéket használtuk viszonyítási pontokként. A TNF- α szekréciónak a mértékét (E) és nitrit mennyiségét (F) a sejtek médiumából az

enzimreakciót (E) vagy a Griess reagenssel történő reakciót (F) követően megjelenő színreakció fotometriás mérésével határoztuk meg. A nitrit esetében 550 nm-en (E) míg a TNF- α esetében 550 nm-en mértük. Az átlag \pm SEM értékeket 3 független kísérlet során határoztuk meg 1 (E) vagy 6 (F) párhuzamos kísérlet elvégzésével. A szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) az - LPS (\dagger), a CypD +/- - LPS ($\#$), vagy a CypD +/- + LPS ($*$) csoportokhoz viszonyítva kaptuk.

A ferulaldehid gátolta az LPS indukálta NF- κ B foszforilációját és az iNOS aktivitását a RAW264,7 makrofág sejtekben

A fentiekben már láttuk, hogy a (50 μ M) ferulaldehid az LPS stimulust követően a mitokondriális pórus nyílását jelző membrán depolarizációját szignifikánsan, de kis mértékben gátolta. Ugyanakkor teljes sejt ROS termelését pedig a kontroll sejteken mért érték alá csökkentette. Valamint azt is láttuk, hogy a ROS az LPS jelátviteli folyamatai mellett elengedhetetlen az NF- κ B p65 alegységének teljes foszforilációjához (Ser536), aktivációjához. Ezen tények a későbbiekben megvizsgáltuk, hogy a ferulaldehid milyen mértékben gátolja az NF- κ B p65 (Ser536) foszforilációját, és az NF- κ B indukálta gének termékei közül az iNOS enzimnek az aktivitását (210). Az immunblot vizsgálat során született eredmények azt mutatták, hogy az LPS (100 ng/ml) kezelést követően a 10. percben az 50 μ M koncentrációban alkalmazott ferulaldehid előkezelés szignifikánsan lecsökkentette az NF- κ B p65 alegységének foszforilációját (24. A ábra). Valamint az LPS kezelést követően a 24. órában a ferulaldehid (50 μ M) – amely a mitokondrium által termelt reaktív oxigén fajtákat teljes mértékben eltávolította – szignifikánsan lecsökkentette az NF- κ B p65 aktivitását jelző luciferáz aktivitását is (24. B ábra), valamint egy vizsgált NF- κ B indukált gén, az iNOS génexpresszióját is (24. C ábra). Az iNOS aktivitását, az enzim termékének a nitrogén-monoxid tovább oxidált alakjának, a nitrit szintnek a sejtek médiumában történő változása alapján a sejtek médiumában Griess reagens használatával határoztuk meg (24. C ábra). Ugyanakkor azt is tapasztaltuk, hogy az LPS koncentrációfüggő módon fokozta az NF- κ B aktivációját jelző relatív luciferáz aktivitást (24. C ábra), és ezt a mitokondrium által termelt reaktív oxigén fajtákat teljes mértékben eltávolító, de mitokondriális depolarizációt részlegesen gátló 50 μ M ferulaldehid azonos mértékben és szignifikánsan csökkentette. Ezek az eredmények jól mutatják azt a tényt, hogy az NF- κ B teljes aktivációjához szükség van a mitokondrium ROS termelésére az LPS kezelés során a RAW264,7 sejtekben.

A Pixel sűrűsége	
Kontroll	236,26 \pm 38,52
LPS 100 ng/ml	25847,32 \pm 4451,44
FA 50 μ M + LPS 100 ng/ml	12882,72 \pm 1872,43
FA 50 μ M	772,22 \pm 23,61

B Relatív luciferáz aktivitás	
Kontroll	1,08 \pm 0,05
LPS 5 ng/ml	10,79 \pm 0,76
LPS 50 ng/ml	16,90 \pm 0,93
FA 50 μ M + LPS 5 ng/ml	3,51 \pm 0,45
FA 50 μ M + LPS 50 ng/ml	3,08 \pm 0,30
FA 50 μ M	1,08 \pm 0,03

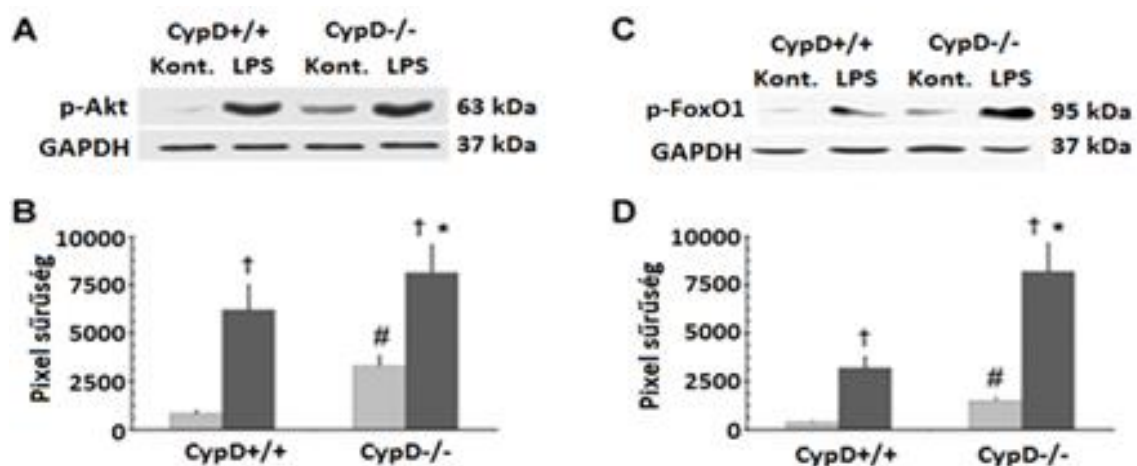
C OD 550	
Kontroll	0,18 \pm 0,01
LPS 100 ng/ml	0,41 \pm 0,02
FA 1 μ M + LPS 100 ng/ml	0,41 \pm 0,02
FA 25 μ M + LPS 100 ng/ml	0,33 \pm 0,01
FA 50 μ M + LPS 100 ng/ml	0,26 \pm 0,01
FA 75 μ M + LPS 100 ng/ml	0,20 \pm 0,01
FA 100 μ M + LPS 100 ng/ml	0,15 \pm 0,01
FA 100 μ M	0,11 \pm 0,00

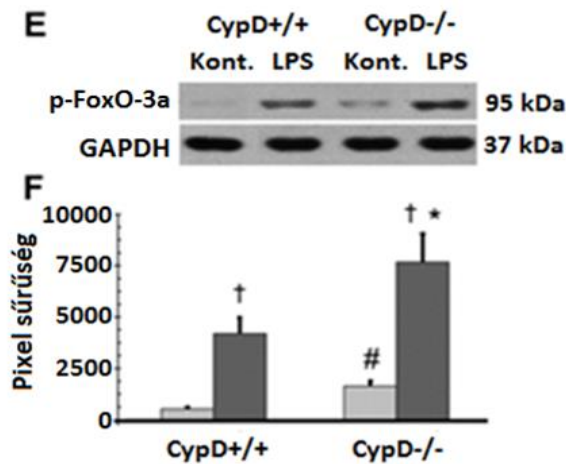
24. ábra A ferulaldehid gátolta az LPS indukálta NF- κ B foszforilációját, és az iNOS aktivitását az RAW264,7 makrofág sejtekben. A foszforilált (ser536) NF- κ B p65 alegység szemikvantitatív mennyiségét 10 perccel az LPS és/vagy ferulaldehid kezelést követően immunblot technikával mértük meg a GAPDH fehérjére vonatkoztatva 4 független kísérlet során (A). Az NF- κ B foszforilált p65 alegységének működését luciferáz aktivitás alapján is meghatároztuk 24 óra múlva az LPS és/vagy ferulaldehid kezelést követően 3 független 4 párhuzamosan rendelkező kísérlet során (B). Megmértük az NF- κ B indukálta gének közé tartozó iNOS enzim

aktivitását indirekt módon, Griess reagens segítségével a nitrit szint mennyiségének változásán keresztül 24 órával az LPS kezelést követően három független 6 párhuzamosal rendelkező kísérlet során (C). A ferulaldehidet minden esetben 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk a sejtekhez.

A CypD hiányának hatása az LPS indukálta Akt1, valamint a FOXO-1 és FOXO-3a foszforilációjára peritoneális makrofágokban

Az LPS a TLR4 sejt felszíni receptorhoz kapcsolódva a MyD88-függő (126, 127) és a My88-független (124, 125) útvonalon egyaránt kiváltja az Akt1 aktivációját (132). Az Akt1 foszforilálja a jelátvitelben utána következő FoxO1 transzkripciós faktort a Thr24, Ser256, Ser319 aminosavakon valamint a FoxO-3a transzkripciós faktort a Thr32, Ser256 és Ser319 aminosavakon. A FoxO1 és a FoxO-3a transzkripciós faktorok ennek köszönhetően inaktíválódnak (132). A FoxO transzkripciós faktorok az oxidatív stressz káros hatásaival szemben védik a sejteket, mivel a DNS károsodásokat javító fehérjéket, valamint az oxidatív stressz csökkentésében elengedhetetlen enzimeket (pl.: MnSOD, kataláz, peroxiredoxin III) kódoló gének átírásáért felelősek (132). Abban az esetben, ha az oxidatív stressz tartósan magas, a FoxO-3a kiváltja a sejtek apoptózisáért felelős proapoptotikus gének expresszióját (132, 133). Immunoblot technikával megvizsgáltuk 90 perc múlva az 1 µg/ml-es LPS kezelést követően az Akt, FOXO-1 és FOXO-3a foszforilációját, foszforiláció-specifikus elődleges antitestekkel a vad típusú (CypD +/+) és CypD hiányos peritoneális makrofág sejtek lizátumában (25. A, B, C, D, E és F ábra). Az eredményeink alapján látható, hogy az LPS kezelés hatására az Akt1 (Ser473) foszforilációja, aktivációja nagyobb volt a CypD hiányos, mint a vad típusú (CypD +/+) peritoneális makrofág sejtekben (25. A és B ábra). Ebből adódóan az Akt1 a FoxO1 és a FoxO-3a transzkripciós faktorokat az LPS-el kezelt vad (CypD+/+) sejtekben kisebb mértékben inaktíválta, mint tette a CypD-/- LPS-el kezelt sejtekben (25. C, D és F ábra). Emellett az is látható, hogy az Akt1 aktivációja, valamint a FoxO1 és FoxO-3a inaktívációja az LPS-el nem kezelt CypD-/- kontroll sejtekben szintén szignifikánsan nagyobb volt (25. A-F ábra). Összességében elmondhatjuk, a CypD hiánya az oxidatív stressz gátlásával együtt fokozta a FoxO1 és a FoxO-3a transzkripciós faktorok inaktívációját az Akt aktivációjának fokozásán keresztül.





25. ábra A CypD hiányának hatása az LPS indukálta Akt1, valamint a FOXO-1 és a FOXO-3a foszforilációjára peritoneális makrofágokban. A vad típusú (CypD +/+) és a CypD hiányos (CypD -/-) peritoneális makrofágokat kezeltük (sötét oszlopok) vagy nem kezeltük (világos oszlopok) (1 µg/ml) LPS-el 90 percen keresztül. Az Akt1 (A és B), a FOXO-1 (C és D) és FOXO-3a (E és F) foszforilációját immunblot technikával határoztuk meg a sejtek lizátumából foszforiláció specifikus Akt1 (p-Akt; A, B), foszforiláció specifikus FOXO-1 (p-FOXO-1; C és D) és FOXO-3a (p-FOXO-3a; E és F) antitestekkel. GAPDH háztartási fehérje mennyiségét alkalmaztuk viszonyítási pontként. Az immunblot sávok (B, D, F) pixel sűrűségei alapján megalkotott oszlopokon (A, C, E) az átlag ± SEM értékeket ábrázoltuk, melyeknek az értékeit 3 független kísérlet során mértük. A szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) az kontroll (†), a CypD +/+ kontroll (#) vagy a CypD +/+ + LPS (*) csoportokhoz viszonyítva kaptuk.

A ferulaldehid gátolta a MAP kinázok aktivációját az LPS-el kezel RAW264,7 sejtekben

A makrofágokban a MyD88-függő és MyD88-független útvonalon egyaránt aktiválódnak a MAP kinázok (ERK1/2, JNK1/2, p38). A MAP kinázok szintén kiváltják a gyulladást kialakító gének expresszióját (iNOS, TNF- α , IL-1 β) (115, 116, 119, 120). Ugyanakkor az oxidatív stressz a makrofágokban hozzájárul az ERK és a p38 aktivációjához is, miközben a JNK aktivációját gátolja (217). Ezek fényében megvizsgáltuk a ferulaldehid hatását a jelátviteli folyamatokra (221). Így a RAW264,7 sejteket (100 ng/ml) LPS-el és/vagy (50 µM) ferulaldehiddel kezeltük. Ezt követően a sejtek lizátumában az LPS kezelést követően 10 és 30 perc múlva meghatároztuk a foszforilált MAP kinázok mennyiségét immunoblottal. A ferulaldehidet minden esetben 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk a sejtekhez (26. A-F ábra). A MAP kinázok foszforilációja a kinázok aktivációját, és végeredményben a gyulladást kiváltó gének átírását jelenti (TNF- α , iNOS) (115, 116, 119, 120). A Tucsek Zsuzsanna cikkében megjelent eredményeink azt mutatták, hogy az LPS kezelést követően az ERK1/2 (26. A ábra) és a p38 (26. C ábra) aktivációja már a 10. percben szignifikánsan megnövekedett, míg a JNK1/2 (26. B ábra) foszforilációja csak a 30. percben volt kifejezett. Később mindhárom kináz aktivációja tovább fokozódott. Az erőteljes antioxidáns ferulaldehid jóval nagyobb mértékben gátolta a JNK és p38 aktivációját az LPS kezelést követően a 30. percben, mint ahogy azt tette az ERK1/2 esetében. Ugyanakkor a ferulaldehid önmagában az ERK aktivációját kis mértékben meg is növelte. Az antioxidáns ferulaldehid esetében így elmondható, hogy hatása eltért a sejt szintű oxidatív stresszt gátló N-acetil-cisztein hatásától. Ugyanis a ferulaldehidnek az N-acetil-ciszteinhez hasonlóan az oxidatív stressz gátlásával a JNK1/2 aktivációjának fokozódását, míg az ERK valamint a P38 foszforilációjának csökkenését kellett volna okoznia az LPS-el kezelt RAW264,7 sejtekben. Tehát a ferulaldehid nemcsak a mitokondrium ROS termelésének csökkentésén keresztül fejtette ki a hatását a gyulladást kialakító MAP kinázok aktivációjára, hanem az LPS jelátviteli folyamataira hatva is kellett, hogy gátolja a MAP kinázok foszforilációját.

A

Pixel sűrűség	
Kontroll	6434,27 ± 650,87
LPS 100 ng/ml 10 perc	43354,26 ± 6267,48
FA 50 μM + LPS 100 ng/ml 10 perc	46544,57 ± 7051,82
FA 50 μM 10 perc	12427,99 ± 1229,79
LPS 100 ng/ml 30 perc	118572,23 ± 12139,67
FA 50 μM + LPS 100 ng/ml 30 perc	83703,56 ± 4610,65
FA 50 μM 30 perc	19444,33 ± 2063,29

B

Pixel sűrűség	
Kontroll	1393,04 ± 307,58
LPS 100 ng/ml 10 perc	4958,65 ± 379,34
FA 50 μM + LPS 100 ng/ml 10 perc	3280,51 ± 507,30
FA 50 μM 10 perc	2781,19 ± 509,22
LPS 100 ng/ml 30 perc	56706,40 ± 5460,10
FA 50 μM + LPS 100 ng/ml 30 perc	11731,60 ± 1685,63
FA 50 μM 30 perc	1721,19 ± 180,46

C

Pixel sűrűség	
Kontroll	883,72 ± 274,53
LPS 100 ng/ml 10 perc	19355,08 ± 3440,34
FA 50 μM + LPS 100 ng/ml 10 perc	8410,83 ± 1500,98
FA 50 μM 10 perc	2560,22 ± 513,36
LPS 100 ng/ml 30 perc	50709,99 ± 6593,67
FA 50 μM + LPS 100 ng/ml 30 perc	16906,43 ± 2923,68
FA 50 μM 30 perc	2070,89 ± 191,75

26. ábra A ferulaldehid hatása a MAP kinázok aktivációjára az LPS-el kezelt RAW264,7 makrofágokban. A foszforilált ERK1/2 (A), foszforilált SAPK/JNK (B) és a foszforilált p38 (C) szintjét megmértük az LPS-el (100 ng/ml) és/vagy a ferulaldehiddel (50μM) kezelt RAW264,7 sejtek lizátumában az LPS kezelést követően 10 és 30 perc múlva. A ferulaldehidet minden esetben 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk a sejtekhez. GAPDH volt a viszonyítási fehérje. ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg a sávok pixel sűrűségét. Az átlag ± SEM értékeket 4 független kísérlet során kaptuk meg.

A ferulaldehid megnövelte a MKP1 foszfatáz expresszióját és fehérje szintjét az LPS-el kezelt RAW264,7 sejtekben

A fenti eredmények azt mutatták, hogy a ferulaldehid az antioxidáns N-acetil-ciszteintől eltérő módon gátolta a MAP kinázok aktivációját. Így jogosan feltételezhetjük, hogy a MAP kinázok inaktivációjában más jelátviteli folyamatok is részt kell, hogy vegyenek. Ezt jól igazolták az MKP1 fehérje aktivációjának változását mutató eredmények is (210). Az MKP1 a gyulladást kialakító MAP kinázokat defoszforilációval inaktiválja (122). Ugyanakkor a MAP kinázok aktivációja kiváltja az MKP1 fehérje szintjének a növekedését, ez a negatív visszacsatolás biztosítja, hogy a gyulladás mértéke kontrollált legyen (312). Az irodalomban olvashatjuk, hogy a makrofágokban az MKP-1 fehérjének a szintje az LPS (100 ng/ml) kezelést követően a 60. percben éri el a maximumát, míg a MAP kinázok aktivációja már a 15. percben a legmagasabb értéken van (313). Az MKP1 fehérje szintjének a növekedésével megindult a MAP kinázok defoszforilációja (313). Majd a későbbiekben a MAP kinázok és az MKP1 aktivációja az LPS kezelést követően a 120. percben jelentősen lecsökken, de az MKP1 szintje még mindig jóval nagyobb, mint a MAP kinázoké (313, 314). Az MKP1, a JNK1/2 és a p38 kinázokat nagyobb mértékben defoszforilálja, mint az ERK1/2 fehérjét (313, 314). Az ERK1/2 defoszforilációjáért főként az MKP2 felelős (315). A MAP kinázok inaktivációjával egy időben megtörténik a makrofágok funkciójának változása is, azaz a gyulladást kialakító, proinflammatorikus citokineket termelő M1 típusú makrofágokat felváltják az antiinflammatorikus citokineket termelő, szöveteket regeneráló M2 típusú makrofágok. Az MKP1 pedig hozzájárul a makrofágok funkciójának váltásához (316). Tucsek Zsuzsannának a cikkében bemutatott eredmények azt mutatták, hogy az LPS kezelést követően a 10. percben lecsökkent az MKP1 expressziója (27. B ábra), amit a 30. percben az MKP1 fehérje mennyiségének csökkenése is követett. A ferulaldehid pedig a 30. percben a kontroll sejteken mért értékre növelte az MKP1 fehérjének a szintjét (27. A ábra). Az LPS kezelést követően a 30. percben az MKP1 mRNS-ének szintje már elérte kontroll sejtekben mért értéket, amit a ferulaldehid előkezelés több mint ötszörösére emelt (27. B ábra). Emellett a ferulaldehid önmagában is ötszörösére növelte az MKP1 expresszióját a 30. percben a kontrollhoz képest (27. B ábra). Az eredmények jól mutatják, hogy a ferulaldehid főként nem

a mitokondrium által termelt ROS eltávolításával fejtette ki a hatását a jelátvitelre, hanem a jelátviteli folyamatok egyik láncszemén, az MKP1 fehérje expressziójának és fehérje mennyiségének a fokozásán keresztül csökkentette a gyulladást kialakító MAP kinázok foszforilációját, aktivációját. Valamint elősegítette, a proinflammatorikus citokinek termelésének csökkenését, és a szövetek regenerálását elősegítő M2 típusú makrofágok megjelenését.

A

Pixel sűrűsége	
Kontroll	37050,67 ± 4780,377
LPS 100 ng/ml 30 perc	14866,67 ± 2816,99
FA 50 μM+ LPS 100 ng/ml 30 perc	34648,33 ± 2981,09
FA 50 μM 30 perc	48620,67 ± 3698,061

B

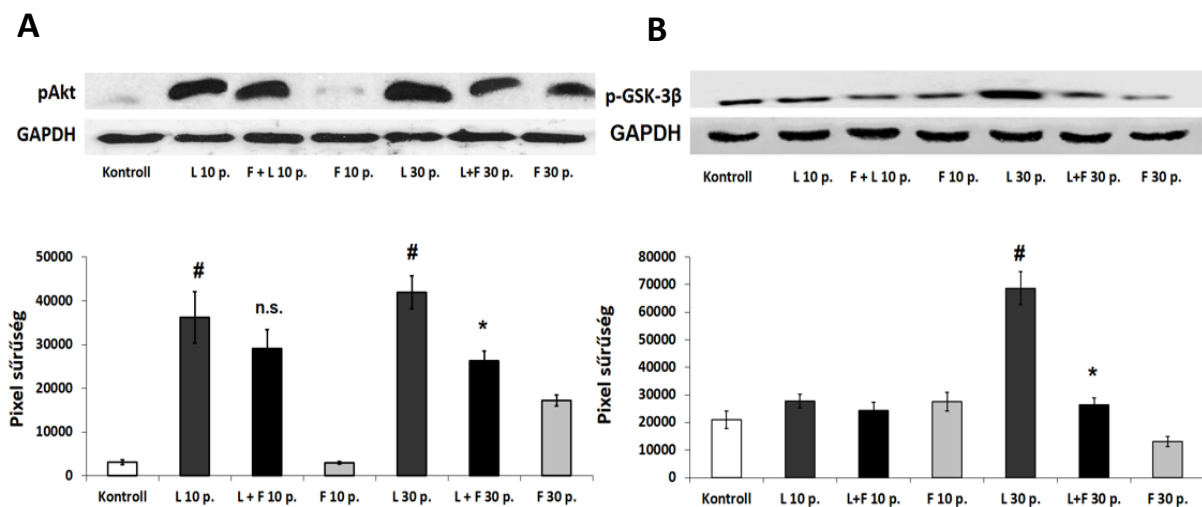
Normalizált mRNS/GapDH	
Kontroll	1,00 ± 0,00
LPS 100 ng/ml 10 perc	0,44 ± 0,04
FA 50 μM + LPS 100 ng/ml 10 perc	0,63 ± 0,08
FA 50 μM 10 perc	0,79 ± 0,05
LPS 100 ng/ml 30 perc	1,13 ± 0,1
FA 50 M + μLPS 100 ng/ml 30 perc	5,41 ± 0,30
FA 50 μM 30 perc	5,05 ± 0,30

27. ábra A ferulaldehid megnövelte az MKP-1 mRNS-ének expresszióját és a fehérje szintjét az LPS-el kezelt RAW264,7 sejtekben. Immunoblot technikával a RAW264,7 sejtek lizátumában az LPS és/vagy ferulaldehid kezelést követően 30 múlva meghatároztuk az MKP-1 szintjét a GAPDH fehérje mennyiségére vonatkozóan négy független kísérlet során (A). Az MKP-1 mRNS szintjét az LPS és/vagy ferulaldehid kezelést követően 10 és 30 perc múlva Q-RT-PCR vizsgálati módszerrel is megmértük a RAW264,7 sejtekben három független kísérlet során. Kontroll génként a GAPD háztartási gént használtuk (B). Minden esetben ferulaldehidet 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk.

A ferulaldehid gátolta az Akt1 és a GSK-3β foszforilációját az LPS-el kezelt RAW264,7 sejtekben

Az Akt1 a MyD88-függő és a MyD88-független útvonalon egyaránt aktiválódik (124-127), és a sejtek túlélését biztosítja (126) a MAPK kinázok foszforilációjának csökkentésével, valamint az NF-κB (p50/p65) aktivációjának gátlásán keresztül (120, 114, 130). Az Akt1 a GSK-3β N-terminálisán lévő 9-es helyzetű szerinjét foszforilálja, és így a GSK-3β nem tudja foszforilációval aktiválni a gyulladást kialakító NF-κB p65 transzkripciósfaktort (114, 130, 131). A ferulaldehiddel azonos szerkezeti elemekkel rendelkező rezveratrol hatására a PKG foszforilálja a GSK-3β kinázt, mely ezt követően foszforilálja a CypD fehérjét, amely így gátolja a belső pórusok nyílását iszkémia-reperfúziót követően az szívizomsejtekben (273). Valószínűsíthető, hogy az az Akt1 által foszforilált GSK-3β is gátolja a belső pórusok nyílását a CypD foszforilációján keresztül. Az irodalomban azt is olvashatjuk, hogy a 200 ng/ml koncentrációban az LPS-el kezelt makrofágokban az LPS kezelést követően folyamatosan növekszik az Akt1 foszforilációja, ami a 120. percben a legnagyobb értéken volt, miközben a MAP kinázok és az MKP1 szintje már jelentősen lecsökkent (314). Ebből adódóan az Akt1 fogja főként biztosítani a gyulladás csökkentését, az M2 típusú makrofágok megjelenését, majd a citokin termelés teljes leállítását. Az irodalomban azt is olvashatjuk, ha a RAW264,7 sejtekben az LPS (100 ng/ml) kezelés hatására megjelenő oxidatív stresszt (10 mM) N-acetil-ciszteinnel gátolták, abban az esetben az Akt1 aktivációja jelentősen lecsökkent (317). Tehát az oxidatív stressz szintén hozzájárul az Akt1 aktivációjához. Így mi megvizsgáltuk, hogy a szintén jó antioxidáns ferulaldehid az LPS kezelést követően vajon milyen hatással volt az Akt1 foszforilációjára, aktivációjára, és az Akt1 hogyan hatott a GSK-3β kinázra (Ser9) foszforilációjára, és így a belső pórusok nyílásának gátlására. A kísérletünk során a RAW264,7 sejteket (100 ng/ml) LPS-el és/vagy (50μM) ferulaldehiddel vagy csak ferulaldehiddel kezeltük (28. A és B ábra). Az eredmények jól mutatták, hogy az Akt1 az LPS kezelést követő a 10. percben már jelentősen aktiválódott (28. A ábra), és az Akt1 az LPS kezelést követően a 30. percben foszforilálta a GSK-3β fehérjét (28. B ábra). Ugyanakkor a ferulaldehid csak a 30. percben szignifikánsan lecsökkentette az LPS kezelést követően az Akt1 foszforilációját (28. A ábra), de az Akt1 foszforilációja még így is szignifikánsan

nagyobb volt, mint az a kontroll sejteknél láttuk. Ugyanakkor a ferulaldehid a 10. és a 30. percben is teljes mértékben meggátolta a GSK-3 β foszforilációját (28. B ábra). A fentiekben már láttuk, hogy az LPS kezelést követően a ferulaldehid a 30. és a 60. percben gátolta a mitokondrium belső pórusainak nyílását. Ezt is figyelembe véve elmondhatjuk, hogy ferulaldehid hatására a nem foszforilált GSK-3 β (Ser9) nem vehetett részt a belső pórusok nyílásának szabályzásában a 30. percben. Ugyanakkor az is látszik, hogy a 30. percben az aktív Akt1 nem foszforilálta a GSK-3 β fehérjét. Így előfordulhat, hogy a GSK-3 β fehérjét a ferulaldehid hatására egy fehérje defoszforilálhatja. Ezt bizonyítja az is, hogy a ferulaldehid önmagában a kontroll érték alá csökkenti a GSK-3 β foszforilációját a 30. percben, miközben az Akt1 aktivációját szignifikánsan fokozza. Mindent összefoglalva elmondhatjuk, hogy a ferulaldehid az LPS kezelést követően a 30. percben bizonyosan nem az GSK-3 β fehérjén keresztül fejtette ki a belső pórusok nyílását gátló hatását. És a ferulaldehid az oxidatív stressz gátlásával gátolhatta az Akt1 aktivációját.

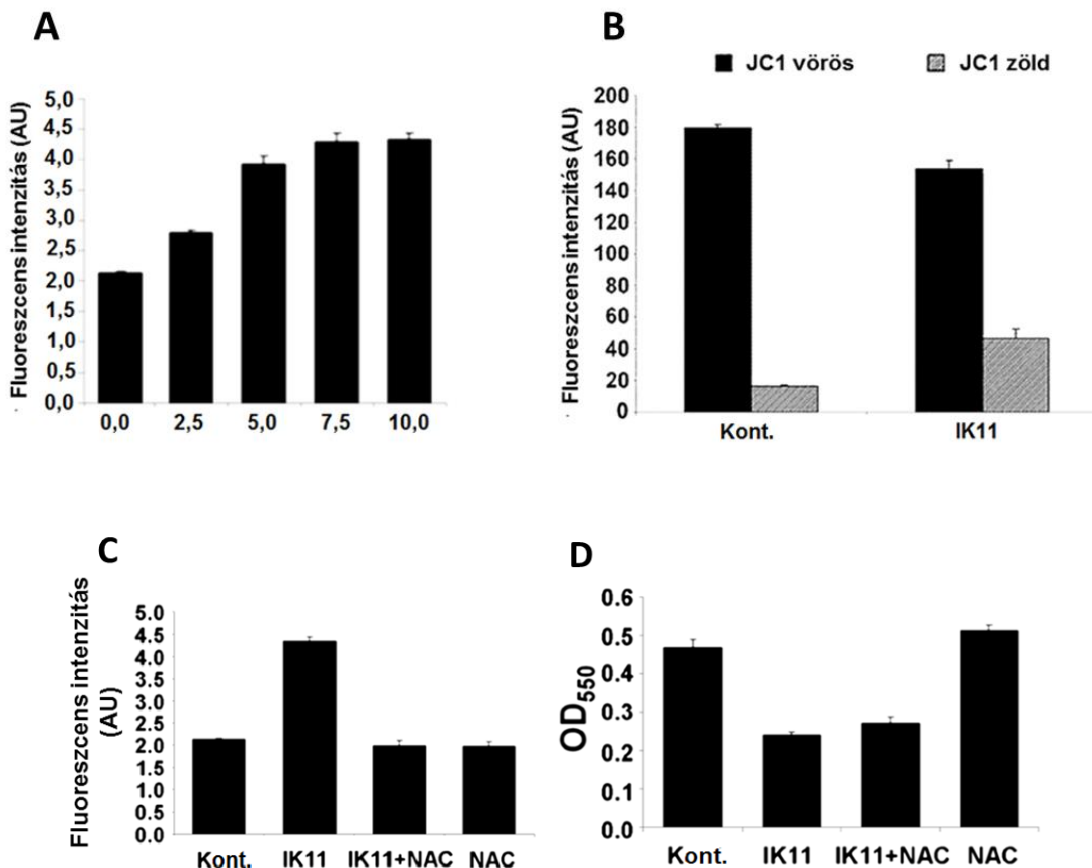


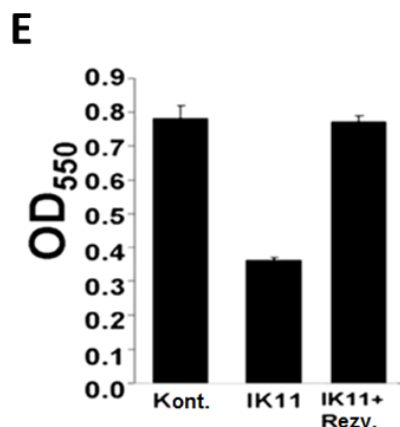
28. ábra A ferulaldehid hatása az Akt1 és a GSK-3 β foszforilációjára az LPS-el kezelt RAW264,7 makrofágokban. A foszforilált Akt (A) és a foszforilált GSK-3 β (B) szintjét megmértük a lipopoliszachariddal (100 ng/ml) és/vagy a ferulaldehiddel (50 μ M) kezelt RAW264,7 sejtek lizátumában az LPS kezelést követően 10 és 30 perc múlva. A ferulaldehidet minden esetben 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk. GAPDH volt a viszonyítási fehérje. ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg az immunoblot ábrákon a sávok pixel sűrűségét. Az átlag \pm SEM értékeket 4 független kísérlet során kaptuk meg és oszlopdiagramokon ábráztuk. A szignifikáns különbségeket ($P < 0,01$) az LPS (*); valamint a kontroll (#) csoportokhoz viszonyítva kaptuk.

Az IKK11 az apoptózist és a nekrozist a HepG2 sejtekben az mPTP-n keresztül is szabályozza

Az irodalomban olvashatjuk, hogy az IK11 az A431 rákos sejtvonal kaspázfüggő, azaz a mitokondrium külső pórusnyíláshoz kapcsolódó apoptózist okozza (318). Valamint azt is megtaláljuk, hogy ha az mPTP rövidebb ideig van nyitva, apoptózist, ha pedig hosszabb ideig van nyitva, akkor pedig nekrozist okoz (166, 290, 291). Ebből adódóan megvizsgáltuk, hogy az IK11 vajon az mPTP nyílásán keresztül váltja-e ki a HepG2 rákos májsejtek halálát. Azaz megtörténik-e a mitokondriumok mPTP nyílását jelző depolarizációja és ebből adódóan a ROS termelése. A vizsgálataink során korábban már láttuk, hogy az IK11 már 1 μ M-os koncentrációban gátolta a sejtek osztódását, mivel megakadályozta a sejtek S fázisból G2 valamint M fázisba való belépését (319). Valamint azt is megfigyeltük, hogy IK11 10 μ M-os koncentrációban az apoptózist a kontroll sejteken mért 4,41%-ról 26,34%-ra, a nekrozist pedig 3,00 %-ról 21,44 %-ra növelte. Ugyanakkor a 25 μ M-os koncentrációjú IK11 sem fokozta tovább a sejtek halálát (319). A későbbiekben az 2,5-10 μ M-os IK11 kezelést

követően C400 reagenssel megvizsgáltuk a mitokondrium ROS termelését, valamint a 10 μ M-os IK11 kezelés után JC-1 festéssel megvizsgáltuk a mitokondrium depolarizációját is. A méréseink során megfigyelhettük, hogy az IK11 koncentráció függő módon fokozta a mitokondrium ROS termelését, ami 10 μ M koncentrációjú IK11 kezelésnél már elérte maximális értékét (29. A ábra). Ugyanakkor az apoptózist és nekrozist kiváltó 10 μ M koncentrációjú IK11 szignifikánsan depolarizálta a mitokondriumok membránját 30 perccel az IK11 stimulus követően (29. B ábra). Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a transz-rezveratrol, mely a CypD foszforilációján keresztül képes gátolni az mPTP nyílását (273), vajon az antioxidáns vagy inkább az mPTP nyílását gátló hatásán keresztül csökkentett-e le az IK11 indukálta sejthalált. Így először C400 segítségével megvizsgáltuk, hogy a rendkívül jó antioxidáns a NAC (2 mM) mekkora mértékben gátolja az teljes sejtben a letális IK11 (10 μ M) kezelést követően a több mint kétszeresére növekedett oxidatív stressz mértékét (29. C ábra). Emellett MTT vizsgálati módszerrel meghatároztuk, hogy NAC és a transz rezveratrol az IK11 kezelést követően fokozza-e a sejtek életképességét (29. D és E ábra). Az eredményink azt mutatták, hogy a NAC teljes mértékben lecsökkentette a teljes sejtben a ROS szintjét, de a sejtek életképességét csak nagyon kis mértékben növelte meg, miközben a transz-rezveratrol a sejtek életképességét a kontroll sejteken mért értékre hozta vissza. A fenti eredményinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy az IK11 (10 μ M) az mPTP nyílásán keresztül szabályozza a sejtek apoptózist és nekrozist. Valamint, hogy a transz-rezveratrol biztosan az mPTP nyílását gátló hatásának is köszönhetően akadályozta meg a proapoptotikus faktorok kiszabadulását, és biztosította az elektrontranszportlánc normál működését, az ATP szintézist, és így állította helyre a sejtek életképességét, miközben gátolta a nekrozist.



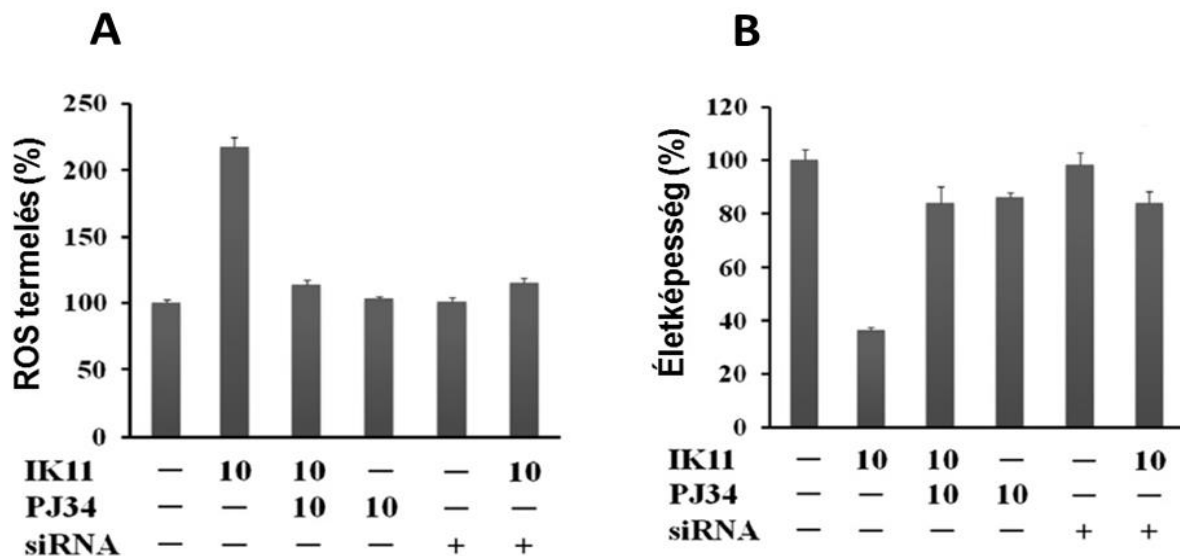


29. ábra. Az IKK11 az apoptózist és a nekrozist a HepG2 sejtekben az mPTP-n keresztül is szabályozza. A HepG2 sejteket 2,5-10 μM koncentrációban IK11-el és/vagy N-acetil-ciszteinnel (2 mM) vagy transz-rezveratrollal kezeltük (50 μM) 24 órán át. A kezelést követően a teljes sejtben a ROS termelést C400 segítségével (A, C), míg a sejtek életképességének változását MTT vizsgálati módszerrel mértük meg (B, D). Míg az oxidált C400 fluoreszcenciájának a változását 485 nm gerjesztési és 555 nm emissziós hullámhosszon mértük meg Glomax Multi+ (Promega, Mannheim, Németország) multimódú olvasóval. A formazánná redukált és savanyított izopropanolban feloldott MTT-t esetében 550 nm hullámhosszon mértük meg az abszorpciót Anthos Labtech 2010 plate-reader segítségével (B). A 10 μM koncentrációban IK11kezelést követően 30 perc múlva JC1 festéssel áramlási citometriás vizsgálatot követően határoztuk meg a mitokondriumok depolarizációját (B). A JC-1 festéskor 488 nm, hullámhosszúságú gerjesztő lézer fényt használtunk, miközben a festék fluoreszcens emissziója a vörös intenzitású (≈ 590 nm) fénytől a zöld felé tolódott (≈ 529 nm) a depolarizáció során (B). Az átlag \pm SEM értékeket 3 független 6 párhuzamossal rendelkező kísérlet során határoztuk meg.

A PJ34 PARP gátló akadályozza a letális IK11 kezelést követően a mitokondrium mPTP nyílását jelző ROS termelését és fokozza a sejtek életképességét

Az irodalomban olvashatjuk, hogy a szeptikus folyamatokban és az oxidatív stressz során is a PARP gátlók valamint a PARP gének elcsendesítése siRNS-el gátolta a jelátviteli folyamatokat, a génexpressziót, az mPTP nyílását jelző depolarizációját, a ROS termelést, az apoptózist és a nekrozist (284, 285, 286, 287). Ugyanakkor a gyulladásozó folyamatokban a CypD génkiütése során láthattuk, hogy a mitokondrium fokozott ROS termelése váltja ki a mitokondriumon kívüli ROS termelés megindulását. Tehát főként a mitokondrium belső pórusának nyílásához kapcsolt ROS termelés felelős a sejtben az oxidatív stresszért. Az irodalomban azt is olvashatjuk, hogy a PARP-1 aktivációját követően, az általa szintetizált PAR képes kiváltani a mitokondrium külső pórusainak nyílását és az intermembrán térben lévő proapoptotikus faktor, az AIF kiszabadulását és a sejtbe helyeződését (288). Azaz az aktivált PARP kiváltja a teljes pórus, az mPTP nyílását. Emellett a PARP kiváltja a NAD^+ és ATP raktárak kimerülését is. Ennek egyik oka, hogy a PARP gátolja a glükolízis egyik enzimét a hexokinázt, és így a szénhidrátok lebontásának gátlásával csökkenti az ATP szintézist. Valamint, mivel kiváltja az mPTP-t, és ennek köszönhetően az elektrontranszportlánc nem megfelelő működését, szintén csökkenti az ATP szintézist. Emellett a PARP által katalizált reakció, energiatermelő folyamatokhoz szükséges NAD^+ -ot használja fel szubsztrátként, szintén csökkenti az ATP előállítását. Így a letális, 10 μM koncentrációjú IK11 indukálta sejthalál esetében is megvizsgáltuk, hogy, vajon a PARP aktivációja szabályozza-e a mitokondrium pórusnyílásán keresztül a mitokondriális ROS termelést és a sejthalált. A kísérlet során három különböző szerkezetű PARP gátlót (PJ34, HO3089, L2286) valamint kis interferáló RNS-t (siRNS) használtunk a letális IK11 kezelés előtt. Majd 24 órával később megvizsgáltuk a HepG2 sejtek életképességét MTT vizsgálati módszerrel, valamint a ROS termelést C400 reagenssel. A vizsgálataink során azt láttuk, hogy

a hogy mindhárom PARP gátló (PJ34, HO3089, L2286) és az siRNS is azonos mértékben gátolta az IK11 életképességet csökkentő hatását, és majdnem teljesen meg is szüntette azt (30. B ábra). Ugyanakkor a PJ34 PARP gátló és az siRNS az letális IK11 indukálta mPTP nyílását jelző ROS termelését teljes mértékben meggátolta (30. A ábra). Emellett a Pj34 önmagában a sejtek életképességét kis kismértékben csökkentett, míg az siRNS önmagában semmilyen tekintetben sem volt hatással (30 A és B ábra). Az eredményeket összefoglalva elmondhatjuk, hogy s PJ34 PARP és az siRNS gátló, mely semmilyen antioxidáns sajátsággal nem rendelkezik, teljes mértékben meggátolta az mPTP nyílását jelző mitokondriális ROS termelést. Ebből adódóan biztosították az elektrontranszportlánc normál működését, és az ATP szintézist. Ennek is köszönhetően az ATP valamint a NAD⁺ raktárak ne merültek ki és a sejtek életképessége jelentősen nem csökkent.

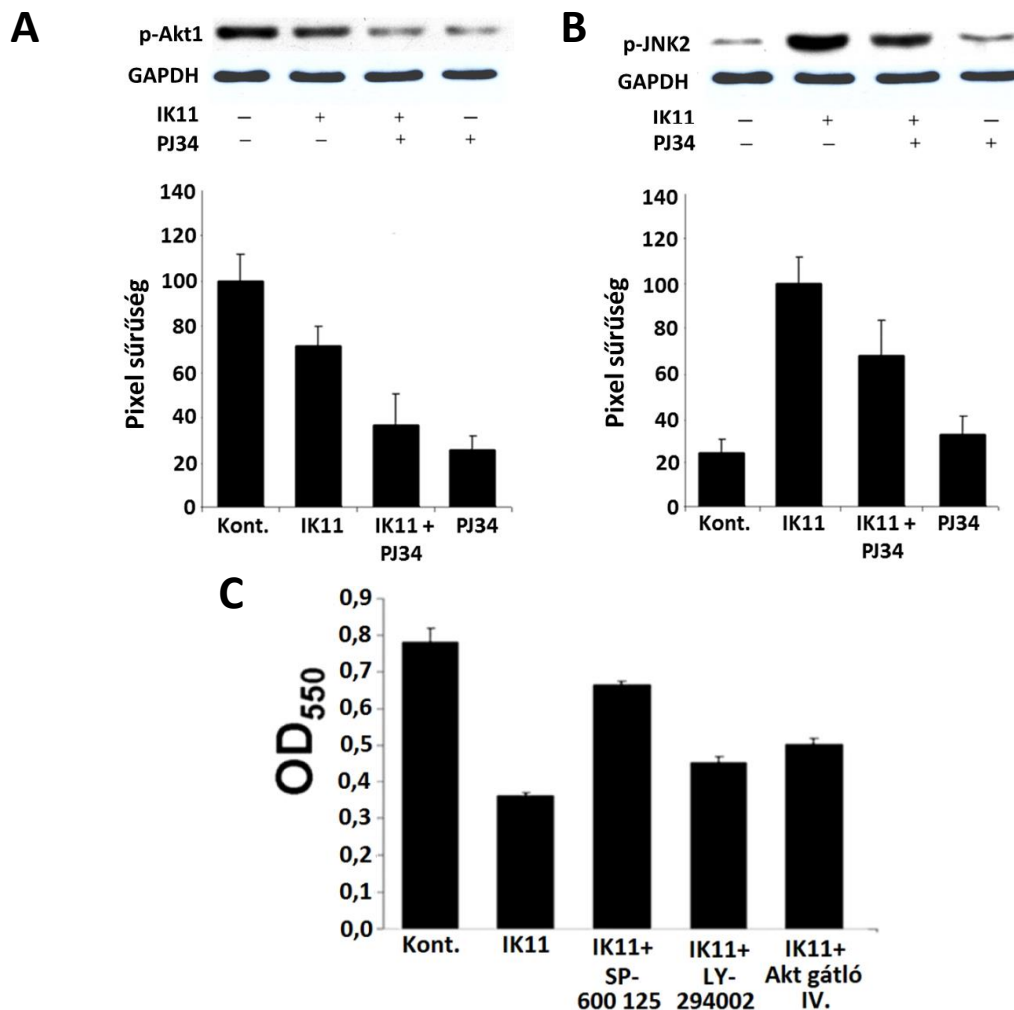


30. ábra A PJ34 PARP gátló akadályozza a letális IK11 kezelést követően a mitokondrium mPTP nyílását jelző ROS termelését és fokozza a sejtek életképességét. A HepG2 sejteket letális, 10 μ M koncentrációjú IK11-el és/vagy 10 μ M koncentrációban PJ34 PARP gátlóval vagy siRNS-el kezeltük 24 órán át. A PJ34 PARP gátlót 1 órával az IK11 kezelés előtt adtuk a sejtekhez. Az siRNS-el pedig 40 órával az IK11 kezelés előtt transzfektáltuk a sejteket. Majd a kezelést követően C400 reagenssel meghatároztuk a ROS szintjét a teljes sejten (A), valamint a sejtek életképességét MTT vizsgálati módszerrel (B). A formazánná redukált és savanyított izopropanolban feloldott MTT-t esetében 550 nm hullámhosszon mértük meg az abszorpciót Anthos Labtech 2010 plate-reader segítségével (B). Míg az oxidált C400 fluoreszcenciájának a változását 485 nm gerjesztési és 555 nm emissziós hullámhosszon Glomax Multi+ (Promega, Mannheim, Németország) multimódú olvasóval megmértük meg. Az átlag \pm SEM értékeket 3 független 6 párhuzamossal rendelkező kísérlet során határoztuk meg és az oszlopdigramokon százalékos értékben ábrázoltuk.

A PJ34 PARP gátló az IK11 kezelést követően az Akt a JNK aktivációjának gátlásán keresztül gátolja a HepG2 sejtek osztódását és váltja ki a sejtek halálát

A PARP aktivációja hatással van a MAP kinázok valamint az Akt aktivációjára (285, 286, 320). Ebből adódóan immunblot technikával megvizsgáltuk, hogy PJ34 PARP gátló milyen hatással van 10 μ M koncentrációjú apoptózist és nekrozist okozó IK11 kezelést követően az Akt1, JNK1/2 és ERK1/2 fehérjék foszforilációjára. A vizsgálataink során azt láttuk, hogy az JNK2, ERK1/2 és a p38 az IKK11 kezelést követő már 10. percben szignifikánsan aktiválódott a HepG2 sejtekben, de a MAP kinázok közül csak a JNK2 foszforilációja növekedett tovább a következő 6 órában. Ugyanakkor a JNK1 foszforilációjára nem volt hatással, miközben az Akt foszforilációját lecsökkentette (31. A ábra). Emellett a PJ34 PARP gátló a JNK1 foszforilációjára nem volt hatással, miközben JNK-2 és az Akt foszforilációját gátolta (31. A és B ábra). A PJ34 önmagában nem volt hatással a JNK1 (319) és JNK2

foszforilációjára, azonban az Akt aktivációját gátolta (31. A és B ábra). Hogy megvizsgáljuk a patofiziológiai hatását ezeknek a kinázoknak, az IKK indukcióját követően a 24. órán, a kinázok aktivációját csökkentő gátlószerrel használata mellett megvizsgáltuk a sejtek életképességét MTT vizsgálati módszerrel (31. C ábra). A vizsgálatok során azt találtuk, hogy a p38 és az ERK1/2 specifikus gátlása nem volt hatással a sejtek életképességére. Abban az esetben, amikor az Akt1 (Ser473) fehérjét két gátlószerrel gátoltuk, melyek közül az LY294002 a PI3K fehérje, az Akt-gátlószer IV az Akt1 foszforilációját gátolta, azt láttuk, hogy az Akt1 aktivációjának gátlása mindkét esetben csak nagyon kis mértékben csökkentette az IK11 kiváltotta életképesség csökkenését (31. C ábra). Tehát patológiás körülmények között az Akt1 csak kis mértékben járult hozzá a sejthalálhoz. Az Akt1 azonban nem patológiás körülmények között, azaz fokozott ROS termelés és apoptózis hiányában, fokozza a HepG2 sejtek osztódását (321). Mivel a PJ34 a kezeltlen HepG2 sejtekben is gátolta az Akt1 aktivációját, ezért megvizsgáltuk, hogy a PJ34 önmagában is gátolja-e a HepG2 sejtek osztódását. A vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a PJ34 meggátolta, hogy a sejtek belépjenek S fázisból a G2 fázisba, majd a mitózisba, így hatása azonos volt az IK11-el (319). Abban az esetben, amikor a letális IK11 kezelés során a JNK-2 aktivációját gátoltuk SP 600125 gátlószerrel, a sejtek életképessége szignifikánsan megnövekedett (31. C ábra). Ezek az eredmények bizonyítják, hogy az IK11 kezelt HEPG2 sejtekben a PJ34 PARP gátló főként a JNK2 fehérje foszforilációjának gátlásán keresztül fokozza sejtek életképességét, miközben az Akt1 aktivációjának gátlásán keresztül főként a sejtek osztódását gátolja. Ugyanakkor a PJ34 annak ellenére, hogy fokozta a sejtek életképességét, az IK11-hez hasonlóan gátolta a sejtek osztódását az Akt1 inaktivációján keresztül.



31. ábra A PJ34 PARP gátló az IK11 kezelést követően az Akt a JNK aktivációjának gátlásán keresztül gátolja a HepG2 sejtek osztódását és váltja ki a sejtek halálát. A HepG2 sejteket letális, 10 μ M koncentrációjú IK11-el és/vagy 10 μ M koncentrációban PJ34 PARP gátlóval vagy SP-600 124 (JNK gátló), LY294002 (PI3K gátló), specifikus Akt gátló IV. gátlószerekkel kezeltük 24 órán az MTT vizsgálat, 6 órán át az immunblot esetén. A PJ34 PARP gátlót 1 órával az IK11 kezelés előtt adtuk a sejtekhez. Immunblot technikával meghatároztuk a foszforilált JNK2 (B ábra) és az Akt1 fehérje (A ábra) mennyiségét, valamint a sejtek életképességét MTT módszerrel vizsgáltuk (C ábra). A formazánná redukált és savanyított izopropanolban feloldott MTT-t esetében 550 nm hullámhosszon mértük meg az abszorpciót Anthos Labtech 2010 plate-reader segítségével (B). Az átlag \pm SEM értékeket 3 független 6 párhuzamossal rendelkező kísérlet során határoztuk meg a sejtek életképességét majd oszlopdiagramon ábrázoltuk. Az immunblot vizsgálat során 3 párhuzamos kísérletet végeztünk, és az átlag \pm SEM értékeket oszlopdiagramon ábrázoltuk.

Diszkusszió

A CypD számos kórfolyamatban kiváltja az mPTP nyílását

Hogy tanulmányozzuk az LPS kezelést követően a CypD mitokondrium belső membránjában lévő pórusainak nyílására gyakorolt hatását, azonos genetikai háttérrel rendelkező vad típusú és Ppif $-/-$ egerekből izoláltunk makrofágokat (166). Az LPS kezelés hatására a makrofágokban mind a belső, mind pedig a külső mitokondriális membránban megjelenhetnek pórusok, melyek nyílását a CypD szabályozza. A külső mitokondriális membránban a BAX és a BAK homo- vagy heterooligomerek, vagy a VDAC homooligomerek, valamint a VDAC és a BAX vagy a BAK heterodimerek nyithatnak pórust (139-170), míg a belső membránban az ATP szintáz dimerek, az ANT és a PiC fehérjék nyitnak pórust a CypD fehérjével való közvetlen kapcsolódásukat követően (174, 178, 185). A belső membránban lévő pórusok nyílása együtt jár a mitokondriális hálózat duzzadásával. Ezt igazolják azok az eredmények, melyek arról számolnak be, hogy a CypD hiánya gátolja az agy és máj sejteiből izolált mitokondriumoknak a duzzadását (166). A CypD hiánya azonban a belső pórusok nyílása mellett néhány esetben a külső pórusok nyílását is gátolta. Így a CypD fehérjének a hiánya, vagy farmakológiai gátlása szignifikánsan lecsökkentette a külső pórusok nyílását az iszkémia-reperfúziót és az infarktust követően a szívizomszövetben, LPS kezelést követően a májszövetben, az oxidatív stressz indukcióját követően az idegszövetben. A CypD hiányának a külső pórusnyílást gátló hatását, ezekben az esetekben a külső pórusokon keresztül kiszabaduló apoptotikus faktorok csökkent mennyisége, és így az apoptózis gátlása mutatott. A CypD hiánya a fentiek mellett gátolta még a hasnyálmirigyben található β -sejtekben található mitokondriumok külső pórusainak nyílását, és így a sejtek apoptózisát (162-165). A makrofágokban valószínűleg az LPS kezelés hatására a mitokondriumok által termelt reaktív oxigén fajták fogják kiváltani a külső pórusok megjelenését, és a sejthalál elindulását, amit a CypD a belső pórusok nyílásának gátlásával gátol (167-170). Általánosságban elmondhatjuk, hogy a CypD hiánya védelmet nyújtott minden olyan betegséggel szemben, ami fokozott oxidatív stresszel, gyulladással, a mitokondrium működésének a sérülésével, valamint sejthalállal jár.

A CsA nem specifikus gátlószere a CypD fehérjének

Számos eredmény született már, melyekben a CypD fehérjének az ATP szintáz dimerekhez, az ANT és a PiC fehérjéhez való közvetlen kapcsolódását, a CypD specifikus gátlószereinek tartott CsA-val gátolták (173, 174, 178, 180, 184, 185, 322). A CsA azonban a kalcineurin gátlásán keresztül gátolja a MAP kinázokat defoszforiláló MKP-1 fehérje expresszióját is, és ez által fokozza a MAP kinázok aktivációját (323). A MAP kinázok (ERK1/2, JNK 1/2, p38) pedig az LPS-el kezelt makrofágokban részt vesznek az NF- κ B (324) és saját transzkripciós faktoraik (AP-1, ELK-1, ATF-2) aktivációjában, és a gyulladás kialakításában (108, 109). A CsA gátolja még a ciklofilin A, B és C fehérjéket is (292). A

ciklofilin A gátlásával immunszuppresszáns hatását fejt ki, miközben a ciklofilin A és B gátlásával a proinflammatorikus citokinek szekrécióját szabályozza (293, 294, 295). Így a CsA nyilvánvalóan nem tekinthető a CypD specifikus gátlószerének, azaz nem megfelelő a mitokondrium belső pórusnyílásának tanulmányozására a makrofágokban az LPS stimulusra megjelenő gyulladási folyamatokban. Annak érdekében, hogy elkerüljük a különböző inhibitorok mellékhatásait, mi egy genetikailag módosított modellt használtunk, melyben a Ppif gén kiütése nem volt hatással sem a vad típusú sejteknek, sem pedig az LPS-el kezelt sejteknek az életképességére hasonlóan a RAW264,7 makrofág jellegű sejtekhez (300).

A CypD hiánya és a ferulaldehid az mPTP nyíláson keresztül gátolja a mitokondrium depolarizációját

Egy korábban megjelent cikkben már leírták, hogy a CsA gátolta a mitokondriális belső pórusok nyílását a vakbél lekötését és kilyukasztását követően kialakuló szepszis során, azáltal hogy fokozta a mitokondrium kalcium-ion tároló képességét, tehát gátolta a kalcium ionok kiengedését az mPTP-n keresztül (301). Mi azonban egy már ismert, és közvetlen módszert, a calcein-AM fluoreszcens festékkel és kobalt-ionokkal történő festést alkalmaztunk (303), hogy kimutassuk azt, hogy az LPS a peritoneális makrofágokban kiváltja a mitokondriumok belső membránjában a pórusok nyílását. Vizsgálataink során kapott eredményeink alapján határozottan kijelenthetjük, hogy a CypD hiánya teljes mértékben meggátolta a mitokondrium belső pórusnyílását az LPS (1 µg/ml) kezelést követően a peritoneális makrofág sejtekben. Ez a megfigyelésünk megfelelt azoknak az eredmények, melyekben a CypD hiánya az idegsejtekben, a szívizomsejtekben és a májsejtekben, valamint a fibroblasztokban az iszkémia-reperfúziót vagy Ca^{2+} -ion túlterhelést követően gátolta a belső pórusok nyílását (166). Ugyanakkor a vad típus peritoneális makrofágokban 60 perccel az LPS (1 µg/ml) kezelést követően a fluoreszcens calceinnel és kobalt-ionokkal történő festéssel már detektálható mennyiségű pórus nyílt a mitokondrium belső membránjában, ami a 90. percben már szemmel is jól látható volt (19. ábra). Ugyanezt tapasztaltuk akkor is, amikor a RAW264,7 makrofág sejteket kezeltük 90 perccig 1 µg/ml koncentrációban LPS-el. A makrofág sejtekben a CypD kiváltja a mitokondriumok belső membránjában megjelenő pórusok nyílását (ANT, PiC), aminek következtében víz és ionok áramlanak a sejtplazmából a mátrixba, miközben a mitokondrium megduzzad, és a mátrix negatív potenciálja lecsökken (167, 166). A belső negatív töltés csökkenéséhez hozzá járulnak még azok a protonok (H^+) is, melyek a kriszták belső teréből áramlanak a CypD fehérjéhez fizikailag kapcsolódott ATP szintáz dimereken keresztül a mátrixba. A peritoneális makrofág sejtekben a mitokondrium membránpotenciál csökkenését, azaz a depolarizációját két feszültségfüggő fluoreszcens intenzitású festékkel (JC-1, TMRM) és áramlási citométerrel mértük meg. Az eredmények azt mutatták, hogy a CypD hiánya 90 perccel az 1µg/ml koncentrációjú LPS kezelést követően szinte teljes mértékben meggátolta a mitokondrium LPS indukálta depolarizációját (18. A, B, c és D ábra). Emellett az LPS-el nem kezelt CypD^{-/-} sejtekben is magasabb értéken volt a mitokondrium membránpotenciálja, mint azt a kontroll vad típusú sejteknél láttuk. Ami egyértelműen bizonyítja, hogy normál körülmények között is kis számban kinyíltak a belső membránban lévő pórusok, amit a CypD fehérjének a hiánya szintén gátolt (18. A, B, C és D ábra). Az eredményeink alapján egyértelműen kimondhatjuk, hogy a CypD a belső pórusnyíláson keresztül szabályozza a mitokondriális membrán depolarizációját az LPS-el kezelt peritoneális makrofágokban. Ugyanakkor létezik a CypD fehérje hatásától független mitokondriális depolarizáció is (300). Mivel a CypD hiánya teljes mértékben meggátolta a mitokondrium depolarizációját 90 perccel az LSP kezelést követően, így egyértelműen kijelenthetjük, hogy a CypD fehérjétől független depolarizáció csak kismértékben járul hozzá a mitokondrium depolarizációjához. Későbbiekben megvizsgáltuk az LPS-el kezelt RAW264,7 makrofág jellegű sejtekben, hogy a ferulaldehid a rezveratrollal való szerkezeti

azonosságainak köszönhetően gátolni fogja-e a mitokondrium pórusnyílását és a depolarizációját (273, 276, 325). A vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy 5 perccel az (100 ng/ml) LPS kezelést követően már depolarizálódott a RAW264,7 sejtek mitokondriumainak membránja, majd a membránpotenciál csökkenése a 30. percben elérte a maximumát. Annak ellenére, hogy a 60 perccel később a membrán még mindig depolarizált maradt, a membránpotenciál megnövekedni kezdett. Ugyanakkor a ferulaldehid előkezelés minden időpontban, kis mértékben, de szignifikánsan csökkentette az LPS indukálta mitokondriális depolarizációt (20. ábra), de nem gátolta meg, mint ahogy azt a CypD hiánya a peritoneális makrofág sejteknél tette. Ezek az eredményeink azt is mutatják, hogy a mitokondrium teljes mértékű depolarizációjakor nem nyílt ki az összes belső membránban lévő pórus. Ugyanakkor azt is megállapíthattuk, hogy a RAW264,7 makrofág sejtek a 100 ng/ml koncentrációban alkalmazott LPS képesek legyőzni. Ezt a megállapításunkat az igazolta, hogy az LPS kezelést követően a 60. percben növekedésnek indul a membránpotenciál, azaz a TLR-4 receptorhoz kapcsolódó a dinamin-függő endocitózissal endoszómákba került LPS-nek meg kellett, hogy történjen a teljes mértékű feldolgozása, eltávolítása. Ezt bizonyítja a makrofágokban jelátviteli folyamatok változása.

A CypD hiánya és a ferulaldehid a belső pórusnyílásokon keresztül gátolja a mitokondriális és az extramitokondriális ROS termelését

A mitokondrium belső membránjában megjelenő pórusok kiváltják a mitokondrium membránjának depolarizációját (325) és végül a légzési elektrontranszportlánc működésének zavarát. Az elektrontranszportlánc nem megfelelő működése során leváló elektronok a reaktív oxigén fajták (ROS) mennyiségét növelik a mitokondriumban és végül a teljes sejtben is. Az irodalom a ROS termelésért főként a mitokondriumot teszi felelőssé, pontosabban a mitokondrium belső membránjában található légzési lánc első tagját, a NADH dehidrogenázt (196, 197). Ugyanakkor azt is olvashatjuk, hogy maga az oxidatív stressz is ki tudja váltani a mitokondrium belső membránjában a pórusok nyílását (226), amely így tovább depolarizálja a mitokondriumok membránját, és fokozza az elektrontranszportlánc működési zavarát és a ROS termelést (167). A vizsgálataink során megfigyeltük, hogy az LPS-el nem kezelt CypD hiányos peritoneális sejtekben a vad típusú kontroll sejtekhez képest a mitokondrium ROS termelése szignifikánsan kisebb volt (21. A, B és C ábra). Ez a megfigyelés alátámasztja azt a tényt, mely szerint fiziológiás körülmények között is szivárognak elektronok a légzési lánc tagjairól, amit jelen esetben a CypD hiánya, a pórus nyílás gátlásával láthatóan gátolt (21. A B és C ábra). Ugyanakkor az eredményeink azt is mutatják, hogy a sejtszintű fiziológiás ROS termeléshez a mitokondrium szintén fiziológiás ROS termelése csak kis mértékben járult hozzá (21. ábra D). Emellett megfigyeltük azt is, hogy a mitokondrium ROS termelése időfüggő csökkenést mutatott a vad LPS-el (1 μ g/ml) kezelt peritoneális sejtekben (21. A B és C ábra). Ugyanakkor a CypD hiánya minden időpontban, azonos mértékben és szignifikánsan csökkentette a mitokondriumoknál az LPS (1 μ g/ml) kezelés hatására megjelenő ROS termelését (21. A, B és C ábra). Ezen eredmények alapján azt feltételezhetjük, hogy a ROS a vad típusú sejtekben valószínűleg károsította a légzési lánc tagjait, és egyéb mitokondriális funkciók sérülését is okozhatta. A mitokondriális hálózat visszafordíthatatlan sérülése pedig a hálózat feldarabolódásához, és a sérült részek elminimálásához vezethetett (167, 169, 170, 326). Azonban avval, hogy a CypD hiánya egy konstans értéken tartotta a mitokondrium ROS termelését az LPS-el kezelt peritoneális makrofágokban mind a három időpontban, meggátolhatta a légzési lánc sérülését is (21. ábra A, B, C). A CypD hiánya azonban nemcsak a mitokondriumban, hanem a teljes sejtben is markánsan gátolta a ROS termelést az LPS indukciót követően 24 óra múlva is (21. D ábra). A vad típusú sejtekben a sejtszintű ROS termelés a 24. órában továbbra is CypD hiányos sejteknél mért értéknél jóval magasabb értéken volt, ami ekkor már nem volt magyarázható csak a mitokondrium ROS termelésével,

mivel az lecsökkent. Így a vad típusú sejtekben már nemcsak a mitokondrium által termelt ROS tartotta fenn teljes sejt ROS termelését (22. D ábra). Ebből adódóan a CypD hiánya közvetett módon gátolta az extramitokondriális ROS megjelenését. Amely talán az oxidatív stressz károsító hatásának köszönhetően különböző enzimreakciók során jelent meg. Ugyanakkor a fiziológias ROS termelést sem a mitokondriumhoz, hanem a sejt többi részében lejátszódó biokémiai folyamatokhoz kapcsolódott.

A CypD hiánya a peritoneális makrofágokban ROS termelésének gátlásán keresztül csökkentette le az NF- κ B p65 aktivációját

A ROS hozzájárul az LPS indukálta gyulladós folyamatok kialakításában elengedhetetlen NF- κ B transzkripciós faktor aktivációjához. Ugyanis az irodalomban azt olvashatjuk, hogy a tüdőben az N-acetil-cisztein mM-os koncentrációban és a NADPH oxidáz egyik alegységének génkiütése az oxidatív stressz gátlásán keresztül meggátolta az NF- κ B aktivációját (217, 218). Az LPS természetesen jelátviteli mechanizmusokon keresztül is kiváltja az NF- κ B aktivációját, és sejtmagba jutását. Az NF- κ B aktivációjához szükség van a fehérje acetilációjára és foszforilációjára, hogy a megfelelő kofaktorokkal együttműködve ki tudja váltani a gyulladást kialakító célgénjeinek az expresszióját. Ezek a gének többek között proinflammatorikus citokineket (TNF- α , IL-1 β , IL-6), kemokineket, adhéziós molekulákat, az iNOS és a ciklooxygenáz-2 fehérjéket kódolják (COX-2) (108, 112, 114). A TNF- α citokin a gyulladás kialakításának elengedhetetlen mediátora, melyet a makrofág sejtek a gyulladás korai szakaszában termelnek. (327). Az iNOS enzim által katalizált reakció terméke, a nitrogén-monoxid (NO), mely az oxidatív stressz kialakításában vesz részt. A NO oxidációját követően megjelenő nitrit szintje alapján, közvetetten vizsgálhatjuk az iNOS expressziójának mértékét (311). Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a peritoneális makrofágokban a CypD hiánya az LPS kezelést követően szignifikánsan lecsökkentett az NF- κ B fehérje p65 alegységének foszforilációját (Ser536), és az aktivált NF- κ B mennyiségét a sejtmagban (23. A, B, C és D ábra). Ugyanakkor a CypD hiánya az LPS kezelést követően az NF- κ B fehérje aktivációjának gátlásával azonos mértékben gátolta két NF- κ B függő gén (TNF- α , iNOS) expresszióját (23. E, F ábra). Tehát a peritoneális makrofágokban a CypD hiánya ugyanúgy gátolta, a ROS termelésén keresztül az NF- κ B aktivációját, mint az tette a NAC és a NADPH oxidáz egyik alegységének génkiütése a tüdőben (217, 218). Az eredményeket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a CypD hiánya a makrofágokban közvetlenül a mitokondriális ROS és közvetetten az extramitokondriális ROS termelésének csökkenésén keresztül gátolta az NF- κ B p65 transzkripciós faktor aktivációját, és az NF- κ B indukált gének (TNF- α , iNOS) expresszióját (23. A, B, C és D ábra).

A ferulaldehid főként az antioxidáns hatásán keresztül gátolta a ROS termelést és ebből adódóan NF- κ B p65 aktivációját

Abban az esetben, amikor a ferulaldehid hatását vizsgáltuk a mitokondriális ROS termelésre az LPS-el (100 ng/ml) kezelt RAW264,7 sejtekben, azt az eredményt kaptuk, hogy a ferulaldehid már 25 μ M-os koncentrációban teljes mértékben eltávolította a teljes sejtben a reaktív oxigén fajtákat (210). Hatása így nagyobb volt, mint azt a CypD hiányának esetében láttuk az LPS-el (1 μ g/ml) kezelt peritoneális makrofágokban (22. ábra). Ugyanakkor a ferulaldehid a mitokondrium belső pórusainak nyílását jelző depolarizációját kisebb mértékben gátolta az LPS-el kezelt RAW264,7 sejtekben, mint azt CypD hiánya tette. Ebből adódóan megállapíthatjuk, hogy a ferulaldehid a mitokondrium által termelt reaktív oxigén fajtákat a szabadgyökfogyó hatásának, és nem a belső mitokondriális pórusok nyílását gátló hatásának köszönhetően távolította el. Az eredményeink azt is megmutatták, hogy az 50 μ M koncentrációban alkalmazott ferulaldehid, mely teljes mértékben eltávolította a reaktív oxigén

fajtákat, már 10 perccel az LPS kezelést követően szignifikánsan lecsökkentette az NF- κ B p65 alegységének foszforilációját (24. A ábra), valamint 24 óra múlva az NF- κ B p65 aktivitását jelző relatív luciferáz aktivitást is. (210). Ugyanakkor az NF- κ B p65 aktivációjának csökkenésével azonos módon gátolta az NF κ B-függő iNOS gén expresszióját jelző nitrit szintet is (24. B és C ábra). Az eredményeket vizsgálva azt is megfigyelhetjük, hogy a különböző koncentrációban alkalmazott LPS koncentrációfüggő módon az NF κ B aktivitását jelző relatív luciferáz aktivitást, amit a sejtben a reaktív oxigén gyököket teljes mértékben eltávolító 50 μ M koncentrációban alkalmazott ferulaldehid mindkét esetben egyaránt teljesen gátolt. Valamint azt is láthatjuk, hogy a ferulaldehid koncentrációfüggő módon gátolta a sejt szintű ROS szintjét, és az NF κ B-függő iNOS expresszióját jelző nitrit mennyiségét is. Ezeknek az adatoknak az ismeretében, már határozottan kijelenthetjük, hogy a mitokondrium által termelt ROS elengedhetetlen az NF κ B aktivációjához és az NF κ B-függő gén, az iNOS expressziójához (24. A, B és C ábra).

A ferulaldehid főként az MKP1 aktivációján keresztül gátolta a MAP kinázok foszforilációját

A gyulladás kialakításában az NF- κ B transzkripciós faktor mellett a MAP kinázok is elengedhetetlenek. Ugyanakkor a MAP kinázok aktivációjára is hatással van az oxidatív stressz. Ezt igazolja egy eredmény, ami arról számol be, hogy a szabadgyökfogó N-acetilcisztein a makrofágokban az LPS kezelés mellett az oxidatív stressz gátlásával lecsökkentette a gyulladás kialakításában részt vevő ERK és p38 aktivációját, miközben a JNK aktivációját fokozta (206). Tehát az oxidatív stressz növekedésével fokozódik az ERK és a p38 aktivációja, míg a JNK aktivációja csökken. A ferulaldehid mint, ahogy láttuk szintén rendkívül jó szabadgyökfogó. Így megvizsgáltuk, hogy a ferulaldehid milyen hatással van az LPS jelátvitel során aktiválódó MAP kinázokra a RAW264,7 sejtekben. A ferulaldehid az LPS kezelést követően a 30. percben a JNK1/2 aktivációját közel a hatodára, a p38 aktivációját pedig körülbelül a negyedére csökkentette (26. A-D ábra), míg az ERK aktivációját pedig az előzőeknél jóval kisebb mértékben gátolta (26. E, F ábra). A ferulaldehid ebből adódóan nemcsak a sejtszintű ROS eltávolításán keresztül fejtette ki a hatását a MAP kinázokra, hanem valamilyen más módon is hatott a MAP kinázok foszforilációjára. Az irodalomban azt is olvashattuk, hogy az LPS (100 ng/ml, 200 ng/ml) hatására a peritoneális makoráfogokban és a RAW264,7 sejtekben a MAP kinázok (ERK1/2, JNK1/2, p38) az LPS kezelést követően a 15. percben érte el a maximális értékét. Majd a kinázok aktivációja az LPS stimulust követően 120. perc felé haladva folyamatosan, szinte a kontroll sejteken mért értékére csökkent (313, 314). Természetesen a 200 ng/ml-es koncentrációban alkalmazott LPS esetében a csökkenés valamivel kisebb volt (314). A MAP kinázok csökkenéséhez jelentős mértékben hozzájárult a MKP1 foszfatáz fehérje mennyiségének a növekedése. A MKP1 szintje az LPS (100 ng/ml, 200 ng/ml) kezelést követően azonban csak a 60. percben érte el a maximumát, majd 120. percben lecsökkent a MAP kinázokhoz hasonlóan, de szintje a MAP kinázokénál még mindig jóval magasabb volt (313, 314). Az MKP1 a MAP kinázokat, főként JNK1/2 és a p38 fehérjéket defoszforilációval inaktíválja, így csökkenti a gyulladást. Ebből adódóan megvizsgáltuk, hogy a ferulaldehid, hogyan hat az LPS kezelést követően az MKP1 fehérje mennyiségére, valamint mRNS szintjére a RAW267,4 sejtekben (27. A-C ábra). Az LPS kezelést követően a 30. percben az MKP-1 fehérje mRNS szintje megegyezett a kontroll sejtekben mért értékkel, amit a ferulaldehid még további ötszörösére emelt (27. A és B ábra). Ugyanakkor a ferulaldehid önmagában is ugyanígy hatott az MKP1 mRNS-ének szintjére. Ezek Az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy a ferulaldehid legnagyobb részt nem az oxidatív stressz gátlásán keresztül gátolta a MAP kinázok aktivációját, hanem az MKP1 fehérje szintjének növelésén keresztül fejtette ki a gyulladást csökkentő hatását.

A ferulaldehid nem a GSK-3 β fehérjén keresztül szabályozza az mPTP nyílását

A makrofágokban a gyulladást az Akt1 is gátolja. Egy cikk arról számolt be, hogy a RAW264,7 sejtekben az Akt1 foszforilációja az LPS (200 ng/ml) kezelés hatására még a 120. percben is folyamatosan növekedett (314). Az Akt1 ugyanakkor lecsökkenti a gyulladást kialakító MAP kinázok, az NF- κ B transzkripció faktor aktivációját és fokozza a GSK-3 β (Ser9) foszforilációját (120, 114, 130, 131). Az LPS (200 ng/ml) kezelést követően az Akt1, valamint az Akt1 által foszforilált GSK-3 β és az MKP1 fehérjeszintjének növekedése szükséges a proinflammatorikus citokineket termelő M1 fenotípusú makrofágokból az antiinflammatorikus citokineket termelő M2 típusú makrofágok megjelenéséhez, majd végül a citokin termelés teljes leállításához (313, 314, 316, 328). Az Akt1 a MyD88-függő és a MyD88-független útvonalon egyaránt aktiválódik, de foszforilációját az oxidatív stressz is fokozza. Ugyanis, amikor a RAW264,7 sejtekben az LPS (100 ng/ml) kezelést követően az oxidatív stresszt a szabadgyökfogó (10 mM) N-acetil-ciszteinnel gátolták, az Akt1 aktivációja közel a felére lecsökkent (317). Ebből adódóan megvizsgáltuk, hogy a sejtben a reaktív oxigén fajtákat teljes mértékben eltávolító (50 μ M) ferulaldehid szintén gátolja-e az Akt1 aktivációját, valamint az Akt1 célgénjének a GSK-3 β kinázok a foszforilációját a RAW264,7 sejtekben. Az eredményeink azt mutatták, hogy az LPS kezelést követően az Akt1 aktivációja már 10. percben megtörtént, amit csak a 30. percben követett a GSK-3 β (Ser9) foszforilációja (28. A és B ábra). Ugyanakkor a ferulaldehid az LPS kezelést követően a 30. percben az Akt1 aktivációját csak lecsökkentette, miközben a GSK-3 β (Ser9) foszforilációját szinte teljes mértékben megakadályozta (28. B ábra). Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az Akt1 aktivációjában szintén részt vehetett a mitokondrium által termelt ROS. Ugyanakkor az is jól látszik, hogy a ferulaldehid teljes mértékben meggátolta a GSK-3 β aktivációját, míg az Akt1 aktivációja még mindig magas értéken maradt. Így feltételezhető, hogy GSK-3 β (Ser9) foszforilációját valamely fehérje defoszforilációval szabályozhatja, vagy foszforilációjáért nemcsak az Akt1 lesz felelős. A GSK-3 β kinázt az Akt1 mellett a PKG is foszforilálhatja a 9. helyzetű szerin aminosavon, amely ezt követően foszforilálhatja a CypD fehérjét, és így gátolja a belső pórusok nyílását (273). Ugyanakkor a mi esetünkben a GSK-3 β az LPS kezelést követően a 30. percben nem foszforilálódott, így nem vehetett részt a CypD foszforilációjában, és a belső pórusok nyílásának gátlásában. Azonban a CypD fehérjét nemcsak a GSK-3 β tudja foszforilálni, hanem a PI3K/Akt útvonalon aktiválódó Akt2 is, amely a CypD fehérjét a 31. szerin aminosavon foszforilálja, így gátolva a belső pórusok nyílását (258). Így előfordulhat, hogy a makrofágokban az Akt2 lesz felelős a CypD foszforilációjáért és a mitokondrium belső membránjában lévő pórusok nyílásának gátlásáért. Ugyanakkor itt azt is meg kell említeni, hogy a ferulaldehid hatása ebben az esetben eltért az azonos szerkezeti elemekkel is rendelkező rezveratrolétól, mivel a rezveratrol az LPS indukálta PI3K/Akt útvonalon aktiválódó Akt1 aktivációját tovább fokozta, azaz közel kétszeresére emelte a RAW264,7 sejtekben. Ugyanakkor a rezveratrol önmagában is megnövelte az Akt1 aktivációját (329). A rezveratrol a PI3K/Akt útvonalon aktiválódó Akt2 aktivációját is tovább fokozta, mely ezt követően foszforilálta a CypD fehérjét a 31. szerin aminosaván, és így gátolta a CypD pórusnyitó hatását (276).

A CypD fehérje hiánya nem a ROS csökkentésén keresztül hatott az Akt1 aktivációjára

Ugyanakkor mi a peritoneális makrofágokban is megvizsgáltuk, hogy a CypD fehérjének a hiánya hogyan hat az Akt1 és az Akt1 célgénjeinek, a FoxO1 és a FoxO-3a transzkripció faktoroknak a foszforilációjára. A vizsgálataink során azt találtuk, hogy az aktivált Akt1 szintje az LPS-el kezelt és nem kezelt a CypD $^{-/-}$ peritoneális sejtekben egyaránt nagyobb volt, mint a megfelelő vad típusú sejtekben (25. A és B ábra). Az Akt1 aktivációjának változását jól mutatta, a célfehérjének a FoxO1 (25. C és D ábra) és FoxO-3a transzkripció faktorok

(25. E és F ábra) foszforilációjának a változása. A FoxO fehérjék aktivációja és inaktivációja is különböző szerin és treonin aminosavaknak foszforilációját igényli. Az aktivált Akt1 foszforilálja a jelátvitelben utána következő FoxO1 transzkripciósfaktort a Thr24 aminosavon és a FoxO-3a transzkripciósfaktort a Thr32 aminosavon, és így inaktiválja őket (132, 133). A FoxO transzkripciósfaktorok az oxidatív stresszel szemben védik a sejteket, mivel a DNS károsodásokat javító fehérjéket, valamint az oxidatív stressz csökkentésében elengedhetetlen enzimeket (pl.: MnSOD, kataláz, peroxiredoxin III) kódoló gének transzkripcióját fokozzák (132). Abban az esetben, ha az oxidatív stressz tartósan magas értéken áll fenn, a FoxO-3a kiváltja a sejtek proapoptotikus génjeinek az expresszióját, és az apoptózist (132, 133). Az LPS indukálta FoxO-1 foszforilációja a CypD hiányos peritoneális makrofágokban sokkal nagyobb mértékben emelkedett, mint az Akt1 foszforilációja, ami jelzi, hogy a FoxO1 Thr24 foszforilációjáért nem egyedül az Akt1 felelős (25. C és D ábra). Ugyanakkor az Akt1 és a FOXO-3a foszforilációjának mértéke azonos volt, így a FoxO-3a foszforilációjáért az Akt1 felelős (25. E és F ábra). Az irodalomban olvashatjuk, hogy az oxidatív stressz nemcsak a mitokondriumok pórus nyílását váltja ki, hanem a mitokondrium DNS-ének, fehérjéinek és lipidjeinek károsításával a mitokondrium feldarabolódását is, a mitofágiát és a sejtek halálát (169=180, 170=181, 212=223, 226=237). Így a vad típusú sejtekben a nagyobb mértékű oxidatív stressz károsító hatásának kiküszöbölésére, az Akt1 aktivációja csökkent, ami a FoxO1 és a FoxO-3a inaktivációjának a csökkentését vonta maga után. A CypD hiányos sejtekben pedig a gyulladást csökkenéséért, és az M2 fenotípusú makrofágok megjelenéséért felelős Akt1 aktivációja, valamint ebből adódóan a FoxO1 és FoxO-3a faktorok inaktivációja is nagyobb volt. Mivel a CypD hiányos sejtekben az LPS kezelést követően az oxidatív stressz láthatóan nem károsította a mitokondriumok működését, nem is volt szükség az oxidatív stressz károsító hatásait ellensúlyozó FoxO1 és FoxO-3a transzkripciósfaktorok működésére, és az Akt1 inaktivációjára ellentétben az LPS-el kezelt vad sejtekkel. Ugyanakkor itt meg kell említeni azt is, hogy mivel az Akt1 szintje az oxidatív stressz csökkentésével együtt nem csökkent, ebben az esetben eltért a NAC és a ferulaldehid hatásától, és a rezveratrol hatásával egyezett meg. Mivel az LPS-el nem kezelt CypD hiányos sejtekben is nagyobb volt az Akt1 aktivációja, jelzi, hogy a CypD fehérje önmagában is valamilyen módon hozzá járult a jelátvitel szabályozásához. Ennek köszönhetően a kontroll CypD hiányos sejtekben egy megváltozott egyensúlyi állapotot alakított ki. Azaz az Akt1 fehérje szintjének változása az LPS-el kezelt CypD hiányos sejtekben nem magyarázható sem avval, hogy az oxidatív stressz a PTEN inaktivációján keresztül fokozta az Akt1 aktivációját (224, 329), sem avval, hogy az Akt1 fehérjék cisztein oldalláncainak oxidációjával diszulfid hidak jelennek meg, melyek lehetővé teszik, hogy foszoprotein foszfatáz-2a fehérjék kapcsolódjanak az Akt1 fehérjékhez, ami az Akt fehérjét defoszforilációval inaktiválja (225). Tehát a CypD fehérjének a hiánya, nem hathatott az oxidatív stressz csökkentésén keresztül az Akt1 aktivációjára.

A HepG2 sejtekben az IK11 a PARP aktivációján keresztül váltja ki az mPTP nyílását, és a JNK-2 aktivációját valamint az Akt1 inaktivációját és a sejtek apoptózisát, nekrozisát

A PARP enzimek közül a PARP1 enzim elengedhetetlen az LPS indukálta gyulladás kialakításában, mivel a PARP1 génkiütetése a normális esetben letális LPS (40 mg/kg) kezelés esetén az egerek 90%-ának túlélését okozta (278). Aminek hátterében a belső szervek és a makrofág sejtek citokin szekréciójának a csökkenése, és a gyulladással kapcsolatos folyamatok aktivációjának a gátlása állt. (278, 284). Emellett a PARP gátlók esetében leírták, hogy a PI3K/Akt útvonalon az Akt1 (Ser473) és a GSK-3 β (Ser9) foszforilációjának fokozásán keresztül gátolták a mitokondrium belső pórusnyílását jelző depolarizációját (287). A és a PI3K/Akt útvonalon foszforilálódó GSK-3 β és Akt2 fehérje a CypD foszforilációjával pedig

gátolja a belső pórusok és az mPTP nyílását (273). Az irodalomban olvashatunk arról, hogy a PI3K/Akt útvonalon aktiválódott Akt2 aktivációjának a gátlásával kiváltották, a glioblasztoma, agyi rákos sejtek halálát. Így mi megvizsgáltuk, hogy az IK11 (2,4-dimethoxyphenyl-E-4-arylidene-3-isochromanone) a HepG2 tumoros máj sejtvonalon vajon a PARP enzimek aktivációján keresztül szabályozza-e a sejtek halálát. Valamint hogy a PARP gátlók, az mPTP nyílásának gátlásával keresztül szabályozzák-e a sejtek halálát. A vizsgálataink során láthattuk, hogy az IK11 már 1 μ M-ban megakadályozta a sejtek S fázisból G2 fázisba és a mitózisba való belépését, azaz a sejtosztódás, és kismértékben csökkentette a sejtek életképességét. Az IK11 10 μ M-ban már jelentősen lecsökkentette a sejtek életképességét, miközben az apoptózist 5,972 a nekrozist 7,147 szorosára növelte a kontroll sejtekhez képest, és kiváltotta a mitokondriumok belső pórusnyílását jelző depolarizációját és a mitokondriális ROS termelést. Mivel IK11 (10 μ M) kezelés hatására jelentősen, több mint kétszeresére emelkedett ROS termelést a NAC teljes mértékben meggátolta, miközben a sejtek életképességre csak kis mértékben hatott, igazolja, az ROS csak kis mértékben járult hozzá a HepH2 sejt életképességének a csökkenéséhez és a sejthalálhoz. Ez talán avval magyarázható, hogy a HepG2 rákos máj sejtvonalban a normál körülmények között is fokozott antioxidáns mechanizmusai kiküszöbölhették a ROS károsító hatásait. Ebből adódóan a transz-rezveratrol bizonyosan nem az antioxidáns hatásának, hanem a cGMP/PKG/GSK-3 β /CypD útvonalon az mPTP nyílást gátló (273) hatásának köszönhetően gátolhatta a mitokondrium intermembrán teréből a proapoptotikus faktorok kiszabadulását, állíthatta helyre az elektrontranszportlánc normál működését, az ATP szintézist és a sejtek életképességét. Ugyanakkor a rezveratrol valószínűleg a mitokondriális pórusnyílásokhoz nem kapcsolódó jelátviteli folyamatokra is hathatott. Így, például a transzkripciós faktorok aktivációjának gátlásán keresztül csökkenthette a PARP aktivációját, mint az a szepszis esetében (330, 282). Valamint a PAR szintjének csökkentésével gátolhatta a sejtek külső mitokondriális pórusnyíláshoz kapcsolódó apoptózist (289). Ezt a felvetést igazolja az, hogy három különböző szerkezetű PARP gátló (PJ34, HO3089, L2286) és az siRNS is közel azonos mértékben és szinte teljesen meggátolta a letális IK11 (10 μ M) kezelést követően a HepG2 sejtekben az mPTP nyílását jelző ROS termelést, valamint a sejtek apoptózist és nekrozist jelző életképesség csökkenését. Ugyanakkor a kísérleteink során arról is meggyőződhattunk, hogy az IK11 kezelést követően a PARP fehérjék a JNK2 fehérje aktivációjának fokozásán keresztül váltják ki a HepG2 sejtek halálát, míg az Akt1 (Ser473) inaktivációján keresztül főként a sejtosztódás leállításáért felelősek. Mivel a PJ34 önmagában és IK11 kezelés mellett is csökkentett az Akt1 aktivációját, amely így nem foszforilálhatta a CypD fehérjét, és nem gátolhatta az mPTP nyílását. Így a CypD valamilyen más jelátviteli útvonalon foszforilálódhatott (Akt2, PKG/GSK3 β). Az irodalomban már a korábbiakban leírták, hogy a rákos máj HepG2 sejtvonalon az ikaritin (prenilflavonoid) a JNK1 aktivációján keresztül váltja ki a kaszpáz-3 aktivációját, és a sejtek apoptózist (321). A citoszolból a mitokondriumba jutó és a mitokondriumban aktiválódó JNK1 fehérje pedig a mitokondriumban megtörténő foszforilációját követően kiváltja a mitokondrium külső pórusainak nyílását, a citokróm-C (Cyt-C) kiszabadulását és az apoptózist (322). A mi vizsgálataink során a JNK2 aktivációja váltotta ki a sejthalált, így előfordulhat, hogy a mitokondriumban jelen lévő JNK2 is az aktivációját követően szintén kiváltja a mitokondrium külső pórusainak nyílását.

Konklúzió

A vizsgálataink során nyilvánvalóvá vált számunkra, hogy a ferulaldehid 25 μ M-nál nagyobb koncentrációban, kis mértékben gátolta a mitokondrium belső pórusnyílást jelző depolarizációját és ROS termelését, miközben a reaktív oxigén fajtákat teljes mértékben

eltávolította a teljes sejtben. A ferulaldehid így a gyulladás egyik komponensének, az oxidatív stressznek az eliminálását nem a belső pórusnyílást gátló hatásának, hanem szabadgyökfogó képességének köszönheti. A ferulaldehid az oxidatív stressz gátlásával egyértelműen gátolta az NF- κ B aktivációját, és a NF- κ B indukálta gének expresszióját. Ugyanakkor a ferulaldehid az EKR1/2, JNK1/2 és a p38 MAP kinázok aktivációjára gyakorolt hatását nemcsak az oxidatív stressz gátlásának köszönheti, hanem egyrészt annak is, hogy megnövelte az MKP1 expresszióját és fehérje szintjét az LPS-el kezelt RAW264,7 sejtekben. Mivel a ferulaldehid az LPS kezelést követően gátolta az M2 fenotípusú makrofágok megjelenéséhez szükséges Akt1 és a GSK-3 β kinázoknak a foszforilációját, ugyanakkor az MKP-1 mennyiségét fokozta. A ferulaldehid MAP kinázokat aktivációját, azaz a gyulladást gátló hatását az MKP-1 aktivációjának köszönheti. Ugyanakkor az MKP-1 nem nélkülözhetetlen sem a gyulladás csökkentésében sem a makrofágok M2 fenotípusának megjelenéséhez. Az Akt1 pedig feltétlenül szükséges a makrofágok citokin termelésének leállításához, és a M2 fenotípusú, a szöveteket regeneráló makrofágok megjelenéséhez. Talán ezért is láttuk korábban az egér kísérleteink során, hogy a ferulaldehid, csak a gyulladás kezdeti szakaszában volt hatásos, de az egerek túlélésre nem volt hatással (313, 314, 316, 323). A ferulaldehid és a rezveratrol valószínűleg a szerkezetileg azonos építőelemeiknek köszönhetően gátolta a MAP kinázok, az NF- κ B aktivációját, az iNOS és a COX2 expresszióját, valamint a mitokondrium depolarizációját a makrofágokban. Ugyanakkor szerkezeti különbségeik lesznek felelősek eltérő hatásaikért. Ugyanis amíg a makrofágokban a rezveratrol fokozta az Akt1 aktivációját, addig a ferulaldehid csökkentette. A rezveratrol a PI3K/Akt útvonal aktivációján, pontosabban az Akt2 és a GSK-3 β fehérjéken keresztül foszforilálta a CypD-t, és gátolta belső pórusok nyílását, a depolarizációt és az ATP szint csökkenését a makrofágokban. A ferulaldehid azonban teljes mértékben meggátolta a GSK-3 β foszforilációján, így ezen az úton nem hathatott a belső pórusok záródására.

A kísérleteink során nyilvánvaló vált, hogy a PARP enzimek, főként a PARP1, nemcsak a szeptikus folyamatok kialakításában vesznek részt a mitokondrium külső és belső membránjában lévő pórusok kinyitásával, a jelátviteli folyamatok mellett. Hanem a HepG2 tumoros máj sejt vonalban az IK11 indukálta apoptózis és nekrozis kiváltásában is. A kísérleteink során megbizonyosodhattunk arról, hogy a letális IK11 kezelés nem a mitokondriális ROS termelésen keresztül csökkentette le a sejtek életképességét, hanem a PARP aktivációjának köszönhetően a megnövekedett JNK-2 és a lecsökkent Akt1 aktivációjának. Míg a JNK2 aktivációja az apoptózist és a nekrozist váltotta ki, addig az Akt1 foszforilációjának a csökkenése a főként sejtosztódás leállításához vezetett. Az antioxidáns tulajdonsággal nem rendelkező PARP gátlók és az siRNS azonban a belső mitokondriális pórusnyílást jelző ROS gátlásának is köszönheti a sejthalál gátlását. A PARP gátlók azonban nemcsak a belső mitokondriális pórusnyílást gátolják, hanem a PAR termelésén keresztül a külső mitokondriális pórusnyílást is, és ennek köszönhetően az apoptózist is (288). Így a PARP gátlók és az siRNS is a poli (ADP-ribóz) reakció gátlásával, a jelátviteli folyamatokra gyakorolt hatásával, a glükolízis biztosításával, a külső pórusnyílás gátlásával és a mitokondrium elektrontranszportlánc normális működésével biztosították NAD⁺ és ATP a raktárak fennmaradását, és gátolták a sejtek apoptózist és nekrozist. Ugyanakkor a PARP gátlók nem a PI3K/Akt1 útvonalon gátolták belső pórusok nyílását az IK11 kezelt HepG2 sejtekben. Így előfordulhat, hogy a PARP gátlók az Akt2 fehérjén vagy a PKG/GSK3 β fehérjén keresztül gátolták a pórusnyílást a CypD foszforilációjával,

A peritoneális makrofágokban CypD hiánya a mitokondrium ROS termelésén keresztül gátolta az NF- κ B aktivációját és az NF- κ B-függő gének (TNF- α , iNOS) átírását. Azonban a CypD hiánya az oxidatív stressz gátlásával a makrofágokban nem gátolta az Akt1 aktivációját, hanem tovább növelte, bizonyítja, hogy a mitokondriális mátrixban lévő CypD fehérje nemcsak a ROS csökkentésével volt hatással a jelátvitelre. Nem ismert még hogy mi

áll ennek a folyamatnak a hátterében, de az irodalomban már olvashatunk arról, hogy a belső pórusnyílás önmagában is kiváltja a jelátvitel változását (324). Azt azonban azt egyértelműen elmondhatjuk, hogy a CypD fehérjének a hiánya avval, hogy gátolta a mitokondrium depolarizációját, a belső pórusok nyílását és ROS termelését, biztosította a mitokondriumok stabil működését. Tehát gátolta a mitokondriumok feldarabolódását, és a sejtek halálát. Emellett a CypD hiánya a makrofágokban az LPS kezelést követően az M2 fenotípus megjelenéséért felelős Akt1 aktivációja tovább fokozta, miközben a gyulladást kialakító NF- κ B aktivációját valamint a makrofágok morfológiai változását gátolta. Ezek az eredmények bizonyítják, hogy a CypD hiánya gátolta a makrofágoknak az adaptív immunfolyamatokat kiváltó klasszikus aktivációját, valamint gátolta a makrofágok gyulladással citokinjeinek a szekrécióját. Ezeknek köszönhetően a CypD hiányának esetében a szepszis hiperinflammatorikus szakaszában az immunfolyamatokat kialakító makrofágok aktivációja nem vált túlzottá. Valamint a citokin vihar nevű jelenséget kialakító proinflammatorikus citokinek szekréciója is szignifikánsan lecsökkent (325). Ez azért is fontos, mivel a hiperinflammatorikus szakaszban megjelenő túlzott immunreakciót és gyulladást kompenzálja a szervezet a hipoinflammatorikus szakasszal. Így a CypD fehérje izomeráz funkcióját gátló gyógyszereknek a kifejlesztése, bizonyítottan megoldást nyújthat a szepszis kezelésében. Különösen az egyre gyakrabban megjelenő multirezisztens mikroorganizmusok esetében. De emellett minden olyan betegségnek a kezelésében is megoldást jelenthetnek, melyek gyulladással, és a mitokondrium által szabályozott sejthalállal járnak (Alzheimer, Parkinson, Huntington, iszkémia-reperfüzót követően a szívizomsejtek halála).

Irodalomjegyzék

1. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003; 29(4):530-8.
2. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest.* 1992; 101(6):1481-3.
3. Boomer JS, To K, Chang KC, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA.* 2011; 306:2594–2605.
4. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 2009; 27:1230–1251.
5. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol.* 2001; 166:6952–6963.
6. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol.* 2002; 168:2493–2500.
7. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 2001;166:6952-63.
8. Carson WF, Cavassani KA, Dou Y, Kunkel SL. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics* 2011; 6: 273-83.
9. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest.* 1991; 88:1747–1754.
10. Rigato O, Salomao R. Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis. *Shock.* 2003; 19:113–116.

11. Sinistro A, Almerighi C, Ciaprini C, et al. Downregulation of CD40 ligand response in monocytes from sepsis patients. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15:1851–1858.
12. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care*. 2011; 15:R183.
13. Kollef KE, Schramm GE, Wills AR, Reichley RM, Micek ST, Kollef MH. Predictors of 30-day mortality and hospital costs in patients with ventilator-associated pneumonia attributed to potentially antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Chest*. 2008; 134:281–287.
14. Luyt CE, Combes A, Deback C, et al. Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 175:935–942.
15. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, et al. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA*. 2008; 300:413–422.
16. Andersson U, Tracey KJ. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2012; 30:313-35.
17. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* 2011; 334:98-101.
18. Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA, Vincent JL, Cohen J, Opal SM, Glauser M, Parsons P, Fisher CJ Jr, Repine JE: Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. *Crit Care Med*. 2000; 28(1):232-5.
19. Matot I, Sprung CL: Definition of sepsis. *Intensive Care Med*. 2001; 27 Suppl 1: S3-9.
20. Torgersen C, Moser P, Luckner G, et al. Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. *Anesth Analg*. 2009; 108:1841–1847.
21. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001; 29(7):1303-10.
22. Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med*. 2012 Mar;40(3):754-61.
23. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med* 2012; 366:2055-64.
24. Vincent JL, Rello J, Marshall J, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 2009; 302:2323-9.
25. Opal SM, Garber GE, LaRosa SP, et al. Systemic host responses in severe sepsis analyzed by causative microorganism and treatment effects of drotrecogin alfa (activated). *Clin Infect Dis* 2003; 37:50-8.
26. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140:805-20.
27. Kondratieva TK, Linge IA, Kondratieva EV, Dyatlov AV, Drutskaya MS, Zvartsev RV, Nedospasov SA, Apt AS. Formation of Compact Aggregates of B-lymphocytes in Lung Tissue during Mycobacterial Infection in Mice Depends on TNF Production by These Cells and Is Not an Element of the Host's Immunological Protection. *Biochemistry (Mosc)*. 2014; 79(12):1358-62.
28. Gerber, J. S., Mosser, D. M. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. *J. Immunol*. 2001; 166, 6861–6868.
29. Camacho-Sandoval R, Del Río Estrada PM, Rivero-Arrieta A, Reyes-Terán G, Bonifaz LC. Differential partial activation phenotype and production of tumour necrosis factor- α by conventional dendritic cells in response to lipopolysaccharide in HIV+ viraemic subjects and HIV+ controllers. *Clin Exp Immunol*. 2014; 178(3):489-503.

30. Shen WC, Wang X, Qin WT, Qiu XF, Sun BW. Exogenous carbon monoxide suppresses *Escherichia coli* vitality and improves survival in an *Escherichia coli*-induced murine sepsis model. *Acta Pharmacol Sin.* 2014; 35(12):1566-76.
31. Chagnon F, Metz CN, Bucala R, Lesur O. Endotoxin-induced myocardial dysfunction: effects of macrophage migration inhibitory factor neutralization. *Circ Res.* 2005; 96(10):1095-102.
32. van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 2008; 8:32-43.
33. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012; 307:2526-33.
34. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 2013; 41:580-637.
35. De Jonghe B, Sharshar T, Lefaucheur J, et al. Paresis acquired in the intensive care unit: a prospective multicenter study. *JAMA* 2002; 288:2859-67.
36. Rojas M, Woods CR, Mora AL, Xu J, Brigham KL. Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005; 288(2):L333-41.
37. Brigham KL, Meyrick B. Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 133(5):913-27.
38. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med* 2010; 38: Suppl:S26-S34.
39. Wang B1, Wu SM, Wang T, Liu K, Zhang G, Zhang XQ, Yu JH, Liu CZ, Fang CC. Pre-treatment with bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits systemic intravascular coagulation and attenuates organ dysfunction in lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation rat model. *Chin Med J (Engl).* 2012; 125(10):1753-9.
40. Warnes G1, Biggerstaff JP, Francis JL. Monocyte B7 and Sialyl Lewis X modulates the efficacy of IL-10 down-regulation of LPS-induced monocyte tissue factor in whole blood. *Br J Haematol.* 1998; 102(2):588-96.
41. Whawell SA1, Scott-Coombes DM, Vipond MN, Tebbutt SJ, Thompson JN. Tumour necrosis factor-mediated release of plasminogen activator inhibitor 1 by human peritoneal mesothelial cells. *Br J Surg.* 1994 ; 81(2):214-6.
42. Okajima K1. Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants. *Immunol Rev.* 2001 Dec;184:258-74. *Immunol Rev.* 2001;184:258-74.
43. Souter PJ1, Thomas S, Hubbard AR, Poole S, Römisch J, Gray E. Antithrombin inhibits lipopolysaccharide-induced tissue factor and interleukin-6 production by mononuclear cells, human umbilical vein endothelial cells, and whole blood. *Crit Care Med.* 2001; 29(1):134-9.
44. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31:1250-6.
45. Goldenberg NM, Steinberg BE, Slutsky AS, Lee WL. Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis. *Sci Transl Med* 2011; 3:88ps25.
46. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth* 2011; 107:57-64.
47. Stoyanoff TR1, Todaro JS2, Aguirre MV3, Zimmermann MC4, Brandan NC4. Amelioration of lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by erythropoietin: involvement of mitochondria-regulated apoptosis. *Toxicology.* 2014; 318:13-21.
48. Jakob Wollborn,¹ Christian Wunder,¹ Jana Stix,³ Winfried Neuhaus,^{1,4} Rapahel R. Bruno,¹ Wolfgang Baar,^{1,5} Sven Flemming,² Norbert Roewer,¹ Nicolas Schlegel,² and

- Martin A. Schick¹ Phosphodiesterase-4 inhibition with rolipram attenuates hepatocellular injury in hyperinflammation in vivo and in vitro without influencing inflammation and HO-1 expression. *J Pharmacol Pharmacother.* 2015; 6(1): 13–23.
49. Fink MP, Evans TW. Mechanisms of organ dysfunction in critical illness: report from a round table conference held in Brussels. *Intensive Care Med.* 2002; 28:369–375.
 50. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med.* 2007; 35:2408–2416.
 51. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010; 11(5):373-84.
 52. Muzio M, Mantovani A The Toll receptor family. *Allergy.* 2001; 56:103-8.
 53. Muzio M, Mantovani A. Toll-like receptors (TLRs) signalling and expression pattern. *J Endotoxin Res.* 2001; 7(4):297-300.
 54. Koblansky AA, Jankovic D, Oh H, Hieny S, Sungnak W, Mathur R, Hayden MS, Akira S, Sher A, Ghosh S Immunity. Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. 2013; 38(1):119-30.
 55. Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science.* 2005; 308(5728):1626-9.
 56. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:588-93.
 57. Mitchell JA, Paul-Clark MJ, Clarke GW, McMaster SK, Cartwright N. Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. *J Endocrinol.* 2007; 193:323-30.
 58. Marshak-Rothstein A, Rifkin IR. Immunologically active antigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Annu Rev Immunol* 25:419-41. in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol.* 2007; 166:249-255.
 59. Liu T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Yajima T, Yoshikai Y. Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. *Infect Immun.* 2002; 70(12):6638-45.
 60. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun.* 2000; 68(12):7010-7.
 61. Zhao ZY, Yang J, Su N, Lei ZX, Chen MM, Jin M, Li FB, Xie YL, Chen L. The change in Toll-like receptor 4 gene expression in skeleton of endotoxemia mice]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2009; 21(1):13-6.
 62. Williams DL, Ha T, Li C, Kalbfleisch JH, Schweitzer J, Vogt W, Browder IW. Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality. *Crit Care Med.* 2003; 31(6):1808-18.
 63. Wagner AD¹, Wittkop U, Prahst A, Schmidt WA, Gromnica-Ihle E, Vorpahl K, Hudson AP, Zeidler H. Dendritic cells co-localize with activated CD4⁺ T cells in giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2003; 21(2):185-92.
 64. Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol.* 2006; 36(4):810-6.
 65. Komai-Koma M, Gilchrist DS, Xu D. Direct recognition of LPS by human but not murine CD8⁺ T cells via TLR4 complex. *Eur J Immunol.* 2009; 39(6):1564-72..
 66. Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol.* 2002; 168:554-61.

67. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* 1999;162(7):3749-52.
68. Raetz CR1, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:635-700.
69. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Di Padova F, et al.: Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 1994; 8(2):217-25.
70. Lodowska J, Wolny D, Weglarz L, Dzierzewicz Z. The structural diversity of lipid A from gram-negative bacteria. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2007; 61:106-21.
71. Falusi András. Az immunológia élettani és molekuláris alapjai. 2001, Semmelweis Kiadó.
72. Topoll HH, Zwadlo G, Lange DE, Sorg C. Phenotypic dynamics of macrophage subpopulations during human experimental gingivitis. *J Periodontal Res.* 1989; 24(2):106-12.
73. Szekanez Z1, Haines GK, Lin TR, Harlow LA, Goerdt S, Rayan G, Koch AE. Differential distribution of intercellular adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-2, and ICAM-3) and the MS-1 antigen in normal and diseased human synovia. Their possible pathogenetic and clinical significance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1994; 37(2):221-31.
74. Djemadji-Oudjijel N1, Goerdt S, Kodelja V, Schmuth M, Orfanos CE. Immunohistochemical identification of type II alternatively activated dendritic macrophages (RM 3/1+3, MS-1+/-, 25F9-) in psoriatic dermis. *Arch Dermatol Res.* 1996; 288(12):757-64.
75. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest.* 1991; 88:1747-1754.
76. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science.* 1993; 259(5102):1739-42.
77. Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek J, Zinkernagel RM, Aguet M. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science.* 1993; 259(5102):1742-5.
78. Nathan C. Mechanisms and modulation of macrophage activation. *Behring Inst Mitt.* 1991; (88):200-7.
79. Gerber J S, Mosser D M. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. *J. Immunol.* 2001; 166, 6861-6868.
80. Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for activated macrophages: the type II activated macrophage. *J. Leukoc. Biol.* 2002; 72, 101-106.
81. Anderson CF, Mosser DM. Cutting edge: biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. *J. Immunol.* 2002; 168, 3697-3701.
82. Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002;14(1):129-35.
83. Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002; 14(1):136-45.
84. Honey K1, Rudensky AY. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(6):472-82.
85. Harding CV, Ramachandra L, Wick MJ. Interaction of bacteria with antigen presenting cells: influences on antigen presentation and antibacterial immunity. *Curr Opin Immunol.* 2003; 15(1):112-9.

86. Wysocka, M., M. Kubin, L. Q. Vieira, L. Ozmen, G. Garotta, P. Scott, G. Trinchieri. Interleukin-12 is required for interferon- γ production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 672
87. Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, Carvajal DM, Wu CY, Ferrante J, Stewart C, Sarmiento U, Faherty DA, Gately MK. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity.* 1996; 4(5):471-81.
88. Chizzolini C, Rezzonico R, De Luca C, Burger D, Dayer JM. Th2 cell membrane factors in association with IL-4 enhance matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) while decreasing MMP-9 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-differentiated human monocytes. *J Immunol.* 2000; 164(11):5952-60.
89. Gibbs DF, Warner RL, Weiss SJ, Johnson KJ, Varani J. Characterization of matrix metalloproteinases produced by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20(6):1136-44.
90. Gibbs DF, Shanley TP, Warner RL, Murphy HS, Varani J, Johnson KJ. Role of matrix metalloproteinases in models of macrophage-dependent acute lung injury. Evidence for alveolar macrophage as source of proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20(6):1145-54.
91. Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol.* 2006; 36(4):810-6.
92. Pone EJ, Zhang J, Mai T, White CA, Li G, Sakakura JK, Patel PJ, Al-Qahtani A, Zan H, Xu Z, Casali P. BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF- κ B pathway. *Nat Commun.* 2012; 3:767.
93. Mohrs, M., Ledermann, B., Kohler, G., Dorfmueller, A., Gessner, A., Brombacher, F. Differences between IL-4 and IL-4 receptor alpha-deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling *J. Immunol.* 1999; 162,7302-7308
94. de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., De Vries, J. E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes *J. Exp. Med.* 1991; 174,1209-1220
95. Bogdan C., Vodovotz Y., Nathan, C. Macrophage deactivation by interleukin 10 *J. Exp. Med.* 1991; 174,1549-1555
96. De Waal, M. R., J. Haanen, H. Spits, M. G. Roncarolo, V. A. Te, C. Figdor, K. Johnson, R. Kastelein, H. Yssel, J. E. De Vries. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down-regulation of class II major histocompatibility complex expression. 1991; *J. Exp. Med.* 174: 915
97. Willems, F., A. Marchant, J. P. Delville, C. Gerard, A. Delvaux, T. Velu, M. de Boer, M. Goldman. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. 1994; *Eur. J. Immunol.* 24: 1007
98. Mills CD1, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000; 164(12):6166-73.
99. Rutschman, R., Lang, R., Hesse, M., Ihle, J. N., Wynn, T. A., Murray, P. J. Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J. Immunol.* 2001; 166, 2173–2177.
100. Schebesch, C., Kodelja, V., Muller, C., Hakij, N., Bisson, S., Orfanos, C. E., Goerd, S. Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro. *Immunology.* 1997; 92, 478–486.
101. Gratchev, A., Guillot, P., Hakiy, N., Politz, O., Orfanos, C. E., Schledzewski, K., Goerd, S. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice

- variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. *Scand. J. Immunol.* 2001; 53, 386–392.
102. Song E., Ouyang N., Horbelt M., Antus B., Wang M., Exton M. S. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell. Immunol.* 2000; 204, 19–28.
103. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J. Immunol.* 2001; 167, 6533–6544.
104. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:197-216.
105. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21:335-76.
106. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol.* 2002; 3(7):667-72.
107. Akir, S, Uematsu S. & Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006; 124, 783–801.
108. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010; 11(5):373-84.
109. Schmukle AC, Walczak H. No one can whistle a symphony alone - how different ubiquitin linkages cooperate to orchestrate NF- κ B activity. *J Cell Sci.* 2012; 125(Pt 3):549-59.
110. Ghosh CC, Ramaswami S, Juvekar A, Vu HY, Galdieri L, Davidson D, Vancurova I. Gene-specific repression of proinflammatory cytokines in stimulated human macrophages by nuclear I κ B α . *J Immunol.* 2010; 185(6):3685-93.
111. Hochrainer K, Racchumi G, Anrather J. Site-specific phosphorylation of the p65 protein subunit mediates selective gene expression by differential NF- κ B and RNA polymerase II promoter recruitment. *J Biol Chem.* 2013; 288(1):285-93.
112. Yang F, Tang E, Guan K, Wang CY. IKK beta plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide. *J Immunol.* 2003;170(11):5630-5.
113. Miskolci V, Rollins J, Vu HY, Ghosh CC, Davidson D, Vancurova I. NF κ B is persistently activated in continuously stimulated human neutrophils. *Mol Med.* 2007; 13(3-4):134-42.
114. Guha M, Mackman N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem.* 2002; 277(35):32124-32.
115. Risco A, del Fresno C, Mambol A, Alsina-Beauchamp D, MacKenzie KF, Yang HT, Barber DF, Morcelle C, Arthur JS, Ley SC, Ardavin C, Cuenda A. p38 γ and p38 δ kinases regulate the Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cytokine production by controlling ERK1/2 protein kinase pathway activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(28):11200-5.
116. Prasad KD, Trinath J, Biswas A, Sekar K, Balaji KN, Guru Row TN. Anthrapyrazolone analogues intercept inflammatory JNK signals to moderate endotoxin induced septic shock. *Sci Rep.* 2014; 4:7214.
117. Rao KM. MAP kinase activation in macrophages. *J Leukoc Biol.* 2001; 69:3-10.
118. Torres M, Forman HJ. Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors.* 2003; 17:287-96.
119. Bozinovski S, Jones JE, Vlahos R, Hamilton JA, Anderson GP. Granulocyte/macrophage-colony-stimulatingfactor (GM-CSF) regulates lung innate

- immunity to lipopolysaccharide through Akt/Erk activation of NFkappaB and AP-1 in vivo. *J Biol Chem.* 2002; 277:42808-14.
120. Luyendyk JP, Schabbauer GA, Tencati M, Holscher T, Pawlinski R, Mackman N. Genetic analysis of the role of the PI3K-Akt pathway in lipopolysaccharide-induced cytokine and tissue factor gene expression in monocytes/macrophages. *J Immunol.* 2008; 180:4218-26.
 121. Denkers EY, Butcher BA, Del Rio L, Kim L Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. *Immunol Rev.* 2004; 201:191-205.
 122. Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene.* 2007; 26(22):3203-13.
 123. Brondello JM, Pouyssegur J, McKenzie FR. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science.* 1999; 286:2514-7.
 124. Joung SM, Park ZY, Rani S, Takeuchi O, Akira S, Lee JY. Akt contributes to activation of the TRIF-dependent signaling pathways of TLRs by interacting with TANK-binding kinase 1. *J Immunol.* 2011; 186(1):499-507.
 125. Ojaniemi M, Glumoff V, Harju K, Liljeroos M, Vuori K, Hallman M. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages. *Eur J Immunol.* 2003; 33(3):597-605.
 126. Cantley LC The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002 ; 296(5573):1655-7.
 127. Lee JS, Nauseef WM, Moeenzakhanlou A, Sly LM, Noubir S, Leidal KG, Schlomann JM, Krystal G, Reiner NE. Monocyte p110alpha phosphatidylinositol 3-kinase regulates phagocytosis, the phagocyte oxidase, and cytokine production. *J Leukoc Biol.* 2007; 81:1548-61.
 128. Brian A. Hemmings, David F. Restuccia PI3K-PKB/Akt Pathway *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4(9): a011189.
 129. Xiao L, Gong LL, Yuan D, Deng M, Zeng XM, Chen LL, Zhang L, Yan Q, Liu JP, Hu XH, Sun SM, Liu J, Ma HL, Zheng CB, Fu H, Chen PC, Zhao JQ, Xie SS, Zou LJ, Xiao YM, Liu WB, Zhang J, Liu Y, Li DW. Protein phosphatase-1 regulates Akt1 signal transduction pathway to control gene expression, cell survival and differentiation. *Cell Death Differ.* 2010 ;17(9):1448-62.
 130. Monick MM, Mallampalli RK, Carter AB, Flaherty DM, McCoy D, Robeff PK, Peterson MW, Hunninghake GW. Ceramide regulates lipopolysaccharide-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activity in human alveolar macrophages. *J Immunol.* 2001; 167(10):5977-85.
 131. Dugo L, Collin M, Allen DA, Patel NS, Bauer I, Mervaala E, Louhelainen M, Foster SJ, Yaqoob MM, Thiemermann C. Inhibiting glycogen synthase kinase 3beta in sepsis. *Novartis Found Symp.* 2007; 280:128-42; discussion 142-6, 160-4.
 132. Wątroba M, Maślińska D, Maśliński S. Current overview of functions of FoxO proteins, with special regards to cellular homeostasis, cell response to stress, as well as inflammation and aging. *Adv Med Sci.* 2012; 57(2):183-95.
 133. Nakamura, T., and Sakamoto, K. Forkhead transcription factor FOXO subfamily is essential for reactive oxygen species-induced apoptosis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2008; 281(1-2), 47-55.
 134. Zoratti M, Szabò I, De Marchi U. Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochim Biophys Acta.* 2005;1706(1-2):40-52.
 135. Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, and Molkenin JD. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *NatCellBio* 2007; 9:550-555.

136. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, and Wallace DC. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 2004; 427: 461-465.
137. Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell*. 2004;15(11):5001-11.
138. Sugioka R, Shimizu S, Tsujimoto Y. Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem*. 2004; 279(50):52726-34.
139. Colombini M . VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem*. 2004; 256-257(1-2):107-15
140. Neumann D, Bückers J, Kastrop L, Hell SW, Jakobs S. Two-color STED microscopy reveals different degrees of colocalization between hexokinase-I and the three human VDAC isoforms. *PMC Biophys*. 2010 Mar 5; 3(1):4.27.
141. Rostovtseva TK, Komarov A, Bezrukov SM, Colombini M. VDAC channels differentiate between natural metabolites and synthetic molecules. *J. Membr. Biol*. 2002;187:147–156.
142. Tan W, Colombini M. VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1768(10):2510-5.
143. Craigen WJ, Graham BH. Genetic strategies for dissecting mammalian and *Drosophila* voltage-dependent anion channel functions. *J Bioenerg Biomembr*. 2008; 40(3):207-12.
144. Abu-Hamad S., Arbel N., Shoshan-Barmatz V. The VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins. *J. Cell Sci*. 2009;122:1906–1916.
145. Zheng Y, Shi Y, Tian C, Jiang C, Jin H, Chen J, Almasan A, Tang H, Chen Q. Essential role of the voltage-dependent anion channel (VDAC) in mitochondrial permeability transition pore opening and cytochrome c release induced by arsenic trioxide. *Oncogene*. 2004; 23(6):1239-47.
146. Malia TJ, Wagner G. NMR structural investigation of the mitochondrial outer membrane protein VDAC and its interaction with antiapoptotic Bcl-xL. *Biochemistry*. 2007; 46(2):514-25.
147. Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, Sheu SS. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr Pharm Des*. 2006;12(18):2249-70.
148. Shi Y, Chen J, Weng C, Chen R, Zheng Y, Chen Q, Tang H. Identification of the protein-protein contact site and interaction mode of human VDAC1 with Bcl-2 family proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 305(4):989-96.
149. Rostovtseva TK, Antonsson B, Suzuki M, Youle RJ, Colombini M, Bezrukov SM. Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. *J Biol Chem*. 2004;279(14):13575-83.
150. Vander Heiden MG, Li XX, Gottlieb E, Hill RB, Thompson CB, Colombini M. Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem*. 2001;276(22):19414-9.
151. Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J*. 2003 Sep 1;22(17):4385-99.
152. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292: 727–730.
153. Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*. 2003 Jul 25;301(5632):513-7.

154. Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, Hekking B, Imahiyerobo TA, Miller C, Frye R, Ploegh H, Kessler BM, Sinclair DA. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell*. 2004; 13(5):627-38.
155. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*. 2000; 14(16):2060-71.
156. Kim H., Tu H. C., Ren D., Takeuchi O., Jeffers J. R., Zambetti G. P., Hsieh J. J., Cheng E. H. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* 2009; 36, 487–499
157. Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol*. 2006; 8(12):1348-58.
158. Ramana KV, Reddy AB, Tammali R, Srivastava SK. Aldose reductase mediates endotoxin-induced production of nitric oxide and cytotoxicity in murine macrophages. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42(8):1290-302.
159. Karabay AZ, Aktan F, Sunguroğlu A, Buyukbingol Z. Methylsulfonylmethane modulates apoptosis of LPS/IFN- γ -activated RAW264,7 macrophage-like cells by targeting p53, Bax, Bcl-2, cytochrome c and PARP proteins. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2014; 36(6):379-89.
160. Li B, Zhang H, Zeng M, He W, Li M, Huang X, Deng DY, Wu J. Bone marrow mesenchymal stem cells protect alveolar macrophages from lipopolysaccharide-induced apoptosis partially by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway. *Cell Biol Int*. 2015; 39(2):192-200.
161. Garedew A, Henderson SO, Moncada S. Activated macrophages utilize glycolytic ATP to maintain mitochondrial membrane potential and prevent apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 2010; 17(10):1540-50.
162. Soriano ME, Nicolosi L, Bernardi P. Desensitization of the permeability transition pore by cyclosporin a prevents activation of the mitochondrial apoptotic pathway and liver damage by tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem*. 2004 ;279(35):36803-8.
163. Lim SY, Hausenloy DJ, Arjun S, Price AN, Davidson SM, Lythgoe MF, Yellon DM. Mitochondrial cyclophilin-D as a potential therapeutic target for post-myocardial infarction heart failure. *J Cell Mol Med*. 2011; 15(11):2443-51.
164. Martin LJ, Adams NA, Pan Y, Price A, Wong M. The mitochondrial permeability transition pore regulates nitric oxide-mediated apoptosis of neurons induced by target deprivation. *J Neurosci*. 2011; 31(1):359-163. 70.
165. Fujimoto K, Chen Y, Polonsky KS, Dorn GW 2nd. Targeting cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition enhances beta-cell survival and prevents diabetes in Pdx1 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(22):10214-9.
166. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkenin JD. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. 2005; 434(7033):658-62.
167. Zhang Y, Fong CC, Wong MS, Tzang CH, Lai WP, Fong WF, Sui SF, Yang M. Molecular mechanisms of survival and apoptosis in RAW264,7 macrophages under oxidative stress. *Apoptosis*. 2005; 10(3):545-56.
168. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol*. 2013; 87(7):1157-80.
169. Frank M, Duvezin-Caubet S, Koob S, Occhipinti A, Jagasia R, Petcherski A, Ruonala MO, Priault M, Salin B, Reichert AS. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a

- mitochondrial fission dependent manner. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1823(12):2297-310.
170. Iqbal S, Hood DA. Oxidative stress-induced mitochondrial fragmentation and movement in skeletal muscle myoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014; 306(12):C1176-83.
171. Lê Quốc K, Lê Quốc D. Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. *Arch Biochem Biophys*. 1988; 265(2):249-57.
172. Okuda K, Hasui K, Abe M, Matsumoto K, Shindo M. Molecular design, synthesis, and evaluation of novel potent apoptosis inhibitors inspired from bongkrekic acid. *Chem Res Toxicol*. 2012 ;25(10):2253-60.
173. Woodfield K, Rück A, Brdiczka D, Halestrap AP. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J*. 1998; 336 (Pt 2):287-90.
174. Halestrap AP, Brenner C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem*. 2003;10(16):1507-25.
175. Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, Zamzami N, Marzo I, Xie Z, Leber B, Andrews D, Duclouhier H, Reed JC, Kroemer G. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene*. 2000;19(3):329-36.
176. Zhivotovsky B, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Adenine nucleotide translocase: a component of the phylogenetically conserved cell death machinery. *Cell Death Differ*. 2009;16(11):1419-25.
177. Baines CP, Molkenin JD. Adenine nucleotide translocase-1 induces cardiomyocyte death through upregulation of the pro-apoptotic protein Bax. *J Mol Cell Cardiol*. 2009; 46(6):969-77.
178. Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabó I, Lippe G, Bernardi P. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(15):5887-92.
179. Giorgio V, Bisetto E, Soriano ME, Dabbeni-Sala F, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P, Lippe G. Cyclophilin D modulates mitochondrial FOF1-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J Biol Chem*. 2009; 284(49):33982-8.
180. Bonora M, Bononi A, De Marchi E, Giorgi C, Lebedzinska M, Marchi S, Patergnani S, Rimessi A, Suski JM, Wojtala A, Wieckowski MR, Kroemer G, Galluzzi L, Pinton P. Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle*. 2013; 12(4):674-83.
181. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, and Wallace DC The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*. 2004; 427: 461-465.
182. Palmieri F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch*. 2004; 447(5):689-709.
183. Schroers A, Krämer R, Wohlrab H. The reversible antiport-uniport conversion of the phosphate carrier from yeast mitochondria depends on the presence of a single cysteine. *J Biol Chem*. 1997;272(16):10558-64.
184. Ko YH, Delannoy M, Hüllihen J, Chiu W, Pedersen PL. Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem*. 2003; 278(14):12305-9.

185. Leung AW, Varanyuwatana P, Halestrap AP. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem.* 2008; 283(39):26312-23.
186. Mannella CA. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1763(5-6):542-8.
187. Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, Metzger K, Frezza C, Annaert W, D'Adamio L, Derks C, Dejaegere T, Pellegrini L, D'Hooge R, Scorrano L, De Strooper B. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell.* 2006; 126(1):163-75.
188. Thomas D, Bron P, Weimann T, Dautant A, Giraud MF, Paumard P, Salin B, Cavalier A, Velours J, Brèthes D. Supramolecular organization of the yeast F1Fo-ATP synthase. *Biol Cell.* 2008; 100(10):591-601.
189. Strauss M, Hofhaus G, Schröder RR, Kühlbrandt W. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.* 2008; 27(7):1154-60. 188.
190. Paumard P, Vaillier J, Coulary B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brèthes D, di Rago JP, Velours J. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* 2002; 21(3):221-30.
191. Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell.* 2006; 126(1):177-89.
192. Yin XM. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene.* 2006; 369:7-19.
192. Cheung EC, Joza N, Steenaart NA, McClellan KA, Neuspiel M, McNamara S, MacLaurin JG, Rippstein P, Park DS, Shore GC, McBride HM, Penninger JM, Slack RS. Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis. *EMBO J.* 2006; 25(17):4061-73.
194. Chinopoulos C, Konràd C, Kiss G, Metelkin E, Töröcsik B, Zhang SF, Starkov AA. Modulation of F0F1-ATP synthase activity by cyclophilin D regulates matrix adenine nucleotide levels. *FEBS J.* 2011; 278(7):1112-25.
195. Garedew A, Henderson SO, Moncada S. Activated macrophages utilize glycolytic ATP to maintain mitochondrial membrane potential and prevent apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 2010; 17(10):1540-50.
196. Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JA, Willems PH. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxid Redox Signal.* 2010; 12(12):1431-70.
197. Ko YH, Delannoy M, Hullihen J, Chiu W, Pedersen PL. Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem.* 2003; 278(14):12305-9.
198. Ferret PJ, Soum E, Negre O, Fradelizi D. Auto-protective redox buffering systems in stimulated macrophages. *BMC Immunol.* 2002; 3:3.
199. Koppenol, W.H. "The Haber-Weiss cycle – 70 years later". *Redox Report.* 2001; 6 (4): 229–234.
200. Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994; 102 Suppl 10:5-12.
201. Chaitidis P, Billett E, Kuban RJ, Ungethuen U, Kuhn H. Expression regulation of MAO isoforms in monocytic cells in response to Th2 cytokines. *Med Sci Monit.* 2005; 11(8):BR259-65.

202. Seiler N, Moulinoux JP, Havouis R, Toujas L. Characterization of amine oxidase activities in macrophages from human peripheral blood. *Biochem Cell Biol.* 1995 May-Jun;73(5-6):275-81.
203. Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;199(3):316-31.
204. Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:825-52.
205. Wizemann TM, Gardner CR, Laskin JD, Quinones S, Durham SK, Goller NL, Ohnishi ST, Laskin DL. Production of nitric oxide and peroxynitrite in the lung during acute endotoxemia. *J Leukoc Biol.* 1994; 56(6):759-68.
206. Hsu, H.Y., and Wen, M.H. Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(25), 22131-22139.
207. Salzano S, Checconi P, Hanschmann EM, Lillig CH, Bowler LD, Chan P, Vaudry D, Mengozzi M, Coppo L, Sacre S, Atkuri KR, Sahaf B, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Mullen L, Ghezzi P. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(33):12157-62.
208. Jung Y, Shin BS, Kim H, Song H, Bae SH, Rhee SG, Jeong W. Redox regulation of lipopolysaccharide-mediated sulfiredoxin induction, which depends on both AP-1 and Nrf2. *J Biol Chem.* 2010; 285(45):34419-28.
209. Isakov E, Weisman-Shomer P1, Benhar M2. Suppression of the pro-inflammatory NLRP3/interleukin-1 β pathway in macrophages by the thioredoxin reductase inhibitor auranofin. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1840(10):3153-61.
210. Tucsek Zs, Radnai B, Racz B, Debreceni B, Priber JK, Dolowschiak T, Palkovics T, Gallyas F Jr, Sumegi B, Veres B. Suppressing LPS-induced early signal transduction in macrophages by a polyphenol degradation product: a critical role of MKP-1. *J Leukoc Biol.* 2011; 89(1):105-11.
211. West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Walsh MC, Choi Y, Shadel GS, Ghosh S. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature.* 2011; 472(7344):476-80.
212. Ricci C, Pastukh V, Leonard J, Turrens J, Wilson G, Schaffer D, Schaffer SW. Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial-superoxide generation and apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 294(2):C413-22.
213. Kissová I, Plamondon LT, Brisson L, Priault M, Renouf V, Schaeffer J, Camougrand N, Manon S. Evaluation of the roles of apoptosis, autophagy, and mitophagy in the loss of plating efficiency induced by Bax expression in yeast. *J Biol Chem.* 2006; 281(47):36187-97.
214. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, Pelliccia G, Luzi L, Minucci S, Marcaccio M, Pinton P, Rizzuto R, Bernardi P, Paolucci F, Pelicci PG. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell.* 2005; 122(2):221-33.
215. Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, Osipov AN, Belikova NA, Kapralov AA, Kini V, Vlasova II, Zhao Q, Zou M, Di P, Svistunenko DA, Kurnikov IV, Borisenko GG. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol.* 2005; 1(4):223-32.
216. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007; 47:143-83.

217. Blackwell, T.S., Blackwell, T.R., Holden, E.P., Christman, B.W., and Christman, J.W. In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation. *J. Immunol.* 1996; 157(4), 1630-1637.
218. Koay, M.A., Christman, J.W., Segal, B.H., Venkatakrishnan, A., Blackwell, T.R., Holland, and S.M., Blackwell, T.S. Impaired pulmonary NF-kappaB activation in response to lipopolysaccharide in NADPH oxidase-deficient mice. *Infect. Immun.* 2001; 69(10), 5991-5996.
219. Carneseccchi S, Deffert C, Pagano A, Garrido-Urbani S, Métrailler-Ruchonnet I, Schäppi M, Donati Y, Matthay MA, Krause KH, Barazzone Argiroffo C. NADPH oxidase-1 plays a crucial role in hyperoxia-induced acute lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Nov 15;180(10):972-81.
220. Kratzer E, Tian Y, Sarich N, Wu T, Meliton A, Leff A, Birukova AA. Oxidative stress contributes to lung injury and barrier dysfunction via microtubule destabilization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012 Nov; 47(5):688-97.
221. Hojo Y, Saito Y, Tanimoto T, Hoefen RJ, Baines CP, Yamamoto K, Haendeler J, Asmis R, Berk BC. Fluid shear stress attenuates hydrogen peroxide-induced c-Jun NH2-terminal kinase activation via a glutathione reductase-mediated mechanism. *Circ Res.* 2002 Oct 18;91(8):712-8.
222. Cho IH, Gong JH, Kang MK, Lee EJ, Park JH, Park SJ, Kang YH. Astragalin inhibits airway eotaxin-1 induction and epithelial apoptosis through modulating oxidative stress-responsive MAPK signaling. *BMC Pulm Med.* 2014 Jul;14:122.
223. Szakmany T, Hauser B, Radermacher P. N-acetylcysteine for sepsis and systemic inflammatory response in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Sep 12; 9:CD006616.
224. Leslie NR, Bennett D, Lindsay YE, Stewart H, Gray A, Downes CP. Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *EMBO J.* 2003; 22:5501-10.
225. Matsuno, K., Iwata, K., Matsumoto, M., Katsuyama, M., Cui, W., Murata, A., Nakamura, H., Ibi, M., Ikami, K., Zhang, J., Matoba, S., Jin, D., Takai, S., Matsubara, H., Matsuda, N., Yabe-Nishimura, C. 2012. NOX1/NADPH oxidase is involved in endotoxin-induced cardiomyocyte apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 53(9), 1718-1728.
226. Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am J Physiol.* 1997; 272(4 Pt 1):C1286-94.
227. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie.* 2002; 84(2-3):153-66.
228. Wi SM, Moon G, Kim J, Kim ST, Shim JH, Chun E, Lee KY. TAK1-ECSIT-TRAF6 complex plays a key role in the TLR4 signal to activate NF- κ B. *J Biol Chem.* 2014 Dec 19;289(51):35205-14.
229. Adhikari NK, Fowler RA, Bhagwanjee S, Rubenfeld GD. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet* 2010; 376:1339-46.
230. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med.* 2006; 34:15-21.
231. Az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Szakmai Kollégium: Az Egészségügyi Minisztérium szakmai irányelve a súlyos szepszis és a szeptikus sokk kezelése.
232. Reber AJ, Chirkova T, Kim JH, et al. Immunosenescence and challenges of vaccination against influenza in the aging population. *Aging Dis.* 2012; 3:68-90.
233. Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34:1589-96.
234. Heenen S, Jacobs F, Vincent JL. Antibiotic strategies in severe nosocomial sepsis: why do we not de-escalate more often? *Crit Care Med* 2012; 40:1404-9.

235. Bochud PY, Bonten M, Marchetti O, Calandra T. Antimicrobial therapy for patients with severe sepsis and septic shock: an evidence-based review. *Crit Care Med* 2004; 32:S495-S512.
236. Safdar N, Handelsman J, Maki DG. Does combination antimicrobial therapy reduce mortality in Gram-negative bacteraemia? A meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:519-27.
237. Brunkhorst FM, Oppert M, Marx G, et al. Effect of empirical treatment with moxifloxacin and meropenem vs meropenem on sepsis-related organ dysfunction in patients with severe sepsis: a randomized trial. *JAMA* 2012; 307:2390-9.
238. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, et al. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA* 2008; 300:413-22.
239. Boomer JS, To K, Chang KC, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 2011; 306:2594-605.
240. Torgersen C, Moser P, Luckner G, et al. Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. *Anesth Analg* 2009; 108:1841-7.
241. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* 2002; 168:2493-500.
242. Unsinger J, McGlynn M, Kasten KR, Hoekzema AS, Watanabe E, Muenzer JT, McDonough JS, Tschoep J, Ferguson TA, McDunn JE, Morre M, Hildeman DA, Caldwell CC, Hotchkiss RS. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J Immunol* 2010; 184:3768-79.
243. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180:640-8.
244. Unsinger J, McGlynn M, Kasten KR, et al. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J Immunol*. 2010; 184:3768–3779.
245. Rosenberg SA, Sportes C, Ahmadzadeh M, et al. IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells. *J Immunother*. 2006; 29:313–319.
246. Kasten KR, Prakash PS, Unsinger J, et al. Interleukin-7 (IL-7) treatment accelerates neutrophil recruitment through gamma delta T-cell IL-17 production in a murine model of sepsis. *Infect Immun*. 2010; 78:4714–4722.
247. Unsinger J, Burnham CA, McDonough J, et al. Interleukin-7 ameliorates immune dysfunction and improves survival in a 2-hit model of fungal sepsis. *J Infect Dis*. 2012; 206:606–616.
248. Venet F, Foray AP, Villars-Mechin A, et al. IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J Immunol*. 2012; 189:5073–5081.
249. Docke WD, Randow F, Syrbe U, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med*. 1997; 3:678–681.
250. Nalos M, Santner-Nanan B, Parnell G, Tang B, McLean AS, Nanan R. Immune effects of interferon gamma in persistent staphylococcal sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185:110–112.
251. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 1998;56:317-33.
252. Fereidoon Shahidi, M. N. "Phenolics in Food and Nutraceuticals." 575. Boca Raton, 2004.

253. Leiro J, Alvarez E, Arranz JA, Laguna R, Uriarte E, Orallo F. Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. *J Leukoc Biol.* 2004; 75:1156-65.
254. Leiro J, Cano E, Ubeira FM, Orallo F, Sanmartin ML. In vitro effects of resveratrol on the viability and infectivity of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:2497-501.
255. Graf E. Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radic Biol Med.* 1992;13:435-48.
256. Joe B, Lokesh BR. Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1224:255-63.
257. Babu PV, Liu D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem.* 2008;15:1840-50.
258. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol.* 2006;72:1439-52.
259. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol.* 2006; 71:1397-421.
260. Anisimova NY, Kiselevsky MV, Sosnov AV, Sadovnikov SV, Stankov IN, Gakh AA. Trans-, cis-, and dihydro-resveratrol: a comparative study. *Chem Cent J.* 2011; 5:88.
261. Yi CO, Jeon BT, Shin HJ, Jeong EA, Chang KC, Lee JE, Lee DH, Kim HJ, Kang SS, Cho GJ, Choi WS, Roh GS. Resveratrol activates AMPK and suppresses LPS-induced NF- κ B-dependent COX-2 activation in RAW264,7 macrophage cells. *Anat Cell Biol.* 2011; v44(3):194-203.
262. Shih A, Davis FB, Lin HY, Davis PJ. Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via a MAPK and p53-dependent mechanism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:1223-32.
263. Zong Y, Sun L, Liu B, Deng YS, Zhan D, Chen YL, He Y, Liu J, Zhang ZJ, Sun J, Lu D. Resveratrol inhibits LPS-induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW264,7 macrophage cells. *PLoS One.* 2012; 7(8):e44107.
264. Li SY, Wang XB, Kong LY. Design, synthesis and biological evaluation of imine resveratrol derivatives as multi-targeted agents against Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2014; 71:36-45.
265. Li T, Zhang J, Feng J, Li Q, Wu L, Ye Q, Sun J, Lin Y, Zhang M, Huang R, Cheng J, Cao Y, Xiang G, Zhang J, Wu Q. Resveratrol reduces acute lung injury in a LPS-induced sepsis mouse model via activation of Sirt1. *Mol Med Rep.* 2013 Jun; 7(6):1889-95.
266. Rios LY, Gonthier MP, Remesy C, Mila I, Lapierre C, Lazarus SA, Williamson G, Scalbert A. Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:912-8.
276. Gonthier MP, Cheynier V, Donovan JL, Manach C, Morand C, Mila I, Lapierre C, Révész C, Scalbert A. Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *J Nutr.* 2003;133:461-7.
268. Adam A, Crespy V, Levrat-Verny MA, Leenhardt F, Leuillet M, Demigne C, Remesy C. The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *J Nutr.* 2002; 132:1962-8.
269. Islam MS, Yoshida H, Matsuki N, Ono K, Nagasaka R, Ushio H, Guo Y, Hiramatsu T, Hosoya T, Murata T, Hori M, Ozaki H. Antioxidant, free radical-scavenging, and NF- κ B-inhibitory activities of phytosteryl ferulates: structure-activity studies. *J Pharmacol Sci.* 2009; 111:328-37.

270. Han MH, Yang XW, Zhong GY, Zhang M. Bioactive constituents inhibiting TNF- α production in fresh rhizome of *Pinellia ternata*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2007; 32:1755-9.
271. Jiang D, Chiaro C, Maddali P, Prabhu KS, Peterson DG. Identification of hydroxycinnamic acid-maillard reaction products in low-moisture baking model systems. *J Agric Food Chem*. 2009; 57:9932-43.
272. Ronchetti D, Borghi V, Gaitan G, Herrero JF, Impagnatiello F. NCX 2057, a novel NO-releasing derivative of ferulic acid, suppresses inflammatory and nociceptive responses in vitro and in vivo models. *Br J Pharmacol*. 2009; 158:569-79.
273. Jinkun Xi, Huihua Wang, Robert A. Muellera, Edward A. Norfleeta, and Zhelong Xua Mechanism for resveratrol-induced cardioprotection against reperfusion injury involves glycogen synthase kinase 3 β and mitochondrial permeability transition pore. *Eur J Pharmacol*. 2009; 604(1-3): 111–116.
274. Varamini B, Sikalidis AK, Bradford KL. Resveratrol increases cerebral glycogen synthase kinase phosphorylation as well as protein levels of drebrin and transthyretin in mice: an exploratory study. *Int J Food Sci Nutr*. 2014; 65(1):89-96.
275. Gim SA, Sung JH, Shah FA, Kim MO, Koh PO. Ferulic acid regulates the AKT/GSK-3 β /CRMP-2 signaling pathway in a middle cerebral artery occlusion animal model. *Lab Anim Res*. 2013; 29(2):63-9.
276. Ghosh JC, Siegelin MD, Vaira V, Favarsani A, Tavecchio M, Chae YC, Lisanti S, Rampini P, Giroda M, Caino MC, Seo JH, Kossenkov AV, Michalek RD, Schultz DC, Bosari S, Languino LR, Altieri DC. J. Adaptive mitochondrial reprogramming and resistance to PI3K therapy. *Natl Cancer Inst*. 2015; 107(3). pii: dju502.
277. Beneke S, Cohausz O, Malanga M, Boukamp P, Althaus F, Bürkle A. Rapid regulation of telomere length is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36(19):6309-17.
278. Oliver FJ, Ménissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF- κ B activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J*. 1999; 18(16):4446-54.
279. Garnier P, Ying W, Swanson RA. Ischemic preconditioning by caspase cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Neurosci*. 2003; 23(22):7967-73.
280. Guastafierro T, Cecchinelli B, Zampieri M, Reale A, Riggio G, Sthandier O, Zupi G, Calabrese L, Caiafa P. CCCTC-binding factor activates PARP-1 affecting DNA methylation machinery. *J Biol Chem*. 2008; 283(32):21873-80.
281. Kraus WL, Lis JT. PARP goes transcription. *Cell*. 2003; 113(6):677-83.
282. Espinoza LA, Smulson ME, Chen Z. Prolonged poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity regulates JP-8-induced sustained cytokine expression in alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42(9):1430-40.
283. Ivana Scovassi A, Diederich M. Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68(6):1041-7.
284. Soriano FG, Liaudet L, Szabó E, Virág L, Mabley JG, Pacher P, Szabó C. Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock*. 2002; 17(4):286-92.
285. Veres B, Radnai B, Gallyas F Jr, Varbiro G, Berente Z, Osz E, Sumegi B. Regulation of kinase cascades and transcription factors by a poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, 4-hydroxyquinazoline, in lipopolysaccharide-induced inflammation in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 310(1):247-55.
286. Veres B, Gallyas F Jr, Varbiro G, Berente Z, Osz E, Szekeres G, Szabo C, Sumegi B. Decrease of the inflammatory response and induction of the Akt/protein kinase B pathway

- by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 inhibitor in endotoxin-induced septic shock. *Biochem Pharmacol.* 2003; 65(8):1373-82.
287. Tapodi A, Debreceni B, Hanto K, Bognar Z, Wittmann I, Gallyas F Jr, Varbiro G, Sumegi B. Pivotal role of Akt activation in mitochondrial protection and cell survival by poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibition in oxidative stress. *J Biol Chem.* 2005; 280(42):35767-75.
288. Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(48):18314-9. Epub 2006 Nov 20.
289. Andrabi SA, Umanah GK, Chang C, Stevens DA, Karuppagounder SS, Gagné JP, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(28):10209-14.
290. Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, Brenner DA, Cascio WE, Trost LC, Nishimura Y, Nieminen AL, Herman B. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr.* 1999; 31(4):305-19.
291. Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A. Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans.* 2000; 28(2):170-7.
292. Fiedler B, Wollert KC. Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca²⁺-calcineurin-NFAT cascade in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 2004; 63(3):450-7.
293. Naoumov NV. Cyclophilin inhibition as potential therapy for liver diseases. *J Hepatol.* 2014; 61(5):1166-74.
294. Nigro P, Pompilio G, Capogrossi MC. Cyclophilin az: a key player for human disease. *Cell Death Dis.* 2013; 4:e888.
295. K Jeong, H Kim, K Kim, S-J Kim, B-S Hahn, G-H Jahng, K-S Yoon, S S Kim, J Ha, I Kang and W Choe. Cyclophilin B is involved in p300-mediated degradation of CHOP in tumor cell adaptation to hypoxia. *Cell Death and Differentiation.* 2014; 21, 438–450.
296. Lorand T, Forgo P, Foldesi A, Osz E, Prokai L. Improved solvent-free synthesis and structure elucidation of (E)- and (Z)-4-arylmethylene-3-isochromanones. *Eur J Org Chem.* 2002; 17:2996–3003.
297. Kalai T, Balog M, Szabo A, Gulyas G, Jeko J, Sumegi B, Hideg K. New poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors with antioxidant activity based on 4-carboxamidobenzimidazole-2-ylpyrroline and –tetrahydropyridine nitroxides and their precursors. *J Med Chem.* 2009; 52(6):1619–1629.
298. Palfi A, Toth A, Kulcsar G, Hanto K, Deres P, Bartha E, Halmosi R, Szabados E, Czopf L, Kalai T, Hideg K, Sumegi B, Toth K. The role of Akt and mitogen-activated protein kinase systems in the protective effect of poly-(ADP-ribose)-polymerase inhibition in Langendorff perfused and in isoproterenol-damaged rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 315(1):273–282.
299. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol.* 2008; Chapter 14:Unit 14.1.
300. Bognar E, Sarszegi Z, Szabo A, Debreceni B, Kalman N, Tucsek Z, Sumegi B, Gallyas F Jr. Antioxidant and anti-inflammatory effects in RAW264.7 macrophages of malvidin, a major red wine polyphenol. *PLoS One.* 2013; 8(6):e65355.
301. Larche J, Lancel S, Hassoun SM, Favory R, Decoster B, Marchetti P, Chopin C, Neviere R. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents sepsis-induced myocardial dysfunction and mortality. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48(2):377-85.
302. Parod RJ, Putney JW Jr. Stimulus-permeability coupling in rat lacrimal gland. *Am J Physiol.* 1980; 239(2):G106-13.

303. V Petronilli, G Miotto, M Canton, M Brini, R Colonna, P Bernardi, and F Di Lisa. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J*. 1999; 76(2): 725–734.
304. Dave M, Attur M, Palmer G, Al-Mussawir HE, Kennish L, Patel J, Abramson SB. The antioxidant resveratrol protects against chondrocyte apoptosis via effects on mitochondrial polarization and ATP production. *Arthritis Rheum*. 2008; 58:2786-97.
305. Shin SM, Cho IJ, Kim SG. Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMP-activated protein kinase-mediated glycogen synthase kinase-3beta inhibition downstream of poly(ADP-ribose)polymerase-LKB1 pathway. *Mol Pharmacol*. 2009; 76:884-95.
306. Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, Recchia FA, Sonntag WE, Pearson K, de Cabo R, Csiszar A. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 299:H18-24.
307. Ungvari Z, Labinskyy N, Mukhopadhyay P, Pinto JT, Bagi Z, Ballabh P, Zhang C, Pacher P, Csiszar A. Resveratrol attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297:H1876-81.
308. Huet O, Obata R, Aubron C, Spraul-Davit A, Charpentier J, Laplace C, Nguyen-Khoa T, Conti M, Vicaut E, Mira JP, Duranteau J. Plasma-induced endothelial oxidative stress is related to the severity of septic shock. *Crit Care Med*. 2007; 35(3):821-6.
309. Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med*. 1999 ; 27(1-2):146-59.
310. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*. 2001 Feb;13(2):85-94.
311. Kelm M, Preik-Steinhoff H, Preik M, Strauer BE. Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway. *Cardiovasc Res*. 1999; 41(3):765-72.
312. Li J, Gorospe M, Hutter D, Barnes J, Keyse SM, Liu Y. Transcriptional induction of MKP-1 in response to stress is associated with histone H3 phosphorylation-acetylation. *Mol Cell Biol*. 2001 Dec;21(23):8213-24.
313. Zhao Q, Wang X, Nelin LD, Yao Y, Matta R, Manson ME, Baliga RS, Meng X, Smith CV, Bauer JA, Chang CH, Liu Y. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *J Exp Med*. 2006; 203(1):131-40.
314. Zhu QY, Liu Q, Chen JX, Lan K, Ge BX. MicroRNA-101 targets MAPK phosphatase-1 to regulate the activation of MAPKs in macrophages. *J Immunol*. 2010;185(12):7435-42.
315. Cornell TT, Rodenhouse P, Cai Q, Sun L, Shanley TP. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 regulates the inflammatory response in sepsis. *Infect Immun*. 2010; 78(6):2868-76.
316. Perdiguero E, Sousa-Victor P, Ruiz-Bonilla V, Jardí M, Caelles C, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. p38/MKP-1-regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair. *J Cell Biol*. 2011; 195(2):307-22.
317. Qi S, Xin Y, Guo Y, Diao Y, Kou X, Luo L, Yin Z. Ampelopsin reduces endotoxic inflammation via repressing ROS-mediated activation of PI3K/Akt/NF-κB signaling pathways. *Int Immunopharmacol*. 2012; 12(1):278-87.
318. Huszár M, Varga A, Horváth A, Loránd T, Agócs A, Idei M, Mandl J, Vántus T, Kéri G. Comparative characterization of experimental and calculated lipophilicity and anti-tumour activity of isochromanone derivatives. *Curr Med Chem*. 2010;17(4):321-33.

319. Radnai B, Antus C, Racz B, Engelmann P, Priber JK, Tucsek Z, Veres B, Turi Z, Lorand T, Sumegi B, Gallyas F Jr. Protective effect of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ34 on mitochondrial depolarization-mediated cell death in hepatocellular carcinoma cells involves attenuation of c-Jun N-terminal kinase-2 and protein kinase B/Akt activation. *Mol Cancer*. 2012;11:34.
320. Bartha E, Solti I, Kereskai L, Lantos J, Plozer E, Magyar K, Szabados E, Kálai T, Hideg K, Halmosi R, Sumegi B, Toth K. PARP inhibition delays transition of hypertensive cardiopathy to heart failure in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 2009; 83(3):501-10.
321. Kaul R, Saha P, Saradhi M, Prasad RL, Chatterjee S, Ghosh I, Tyagi RK, Datta K. Overexpression of hyaluronan-binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR) in HepG2 cells leads to increased hyaluronan synthesis and cell proliferation by up-regulation of cyclin D1 in AKT-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2012; 287(23):19750-64.
322. Waldmeier PC, Zimmermann K, Qian T, Tinteln-Blomley M, Lemasters JJ. Cyclophilin D as a drug target. *Curr Med Chem*. 2003 ;10(16):1485-506.
323. Lim HW, New L, Han J, Molkentin JD. Calcineurin enhances MAPK phosphatase-1 expression and p38 MAPK inactivation in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2001; 276(19):15913-9.
324. Karin M, Gallagher E. TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF6 signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunol Rev*. 2009; 228(1):225-40.
325. Mio Y, Shim YH, Richards E, Bosnjak ZJ, Pagel PS, Bienengraeber M. Xenon preconditioning: the role of prosurvival signaling, mitochondrial permeability transition and bioenergetics in rats. *Anesth Analg*. 2009; 108(3):858-66.
326. Cai J, Jones DP. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem*. 1998; 273(19):11401-4.
327. Ulloa L, Tracey KJ. The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends Mol Med*. 2005; 11(2):56-63.
328. Michael Martin, Kunal Rehani, Richard S Jope, and Suzanne M Michalek. Toll-like receptor—mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol*. 2005; 6(8): 777–784.
329. Zong Y, Sun L, Liu B, Deng YS, Zhan D, Chen YL, He Y, Liu J, Zhang ZJ, Sun J, Lu D. Resveratrol inhibits LPS-induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW 264.7 macrophage cells. *PLoS One*. 2012;7(8):e44107.
330. Jakus PB, Kalman N, Antus C, Radnai B, Tucsek Z, Gallyas F Jr, Sumegi B, Veres B. TRAF6 is functional in inhibition of TLR4-mediated NF- κ B activation by resveratrol. *J Nutr Biochem*. 2013; 24(5):819-23.
321. He J, Wang Y, Duan F, Jiang H, Chen MF, Tang SY. Icaritin induces apoptosis of HepG2 cells via the JNK1 signaling pathway independent of the estrogen receptor. *Planta Med*. 2010; 76(16):1834-9.
322. Aoki H, Kang PM, Hampe J, Yoshimura K, Noma T, Matsuzaki M, Izumo S. Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2002;277(12):10244-50.
323. Radnai B, Tucsek Z, Bogнар Z, Antus C, Mark L, Berente Z, Gallyas F Jr, Sumegi B, Veres B. Ferulaldehyde, a water-soluble degradation product of polyphenols, inhibits the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mice. *J Nutr*. 2009 ;139(2):291-7.
324. Bernardi P, Rasola A, Forte M, Lippe G. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol Rev*. 2015; 95(4):1111-55.

325. Fonai F, Priber JK, Jakus PB, Kalman N, Antus C, Pollak E, Karsai G, Tretter L, Sumegi B, Veres B. Lack of cyclophilin D protects against the development of acute lung injury in endotoxemia. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(12):2563-2573.