

***MAP kinázok és a PI3K-Akt útvonal szerepe inflammációban és  
oxidatív stresszben***

**PhD tézis**

**Bognár Eszter**

**Programvezető: Prof. Dr. Sümegi Balázs DSci**

**Témavezető: Ifj. Prof. Dr. Gallyas Ferenc DSci**



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

2013

## Rövidítések

AP-1: aktivátor protein-1

Akt: protein kináz B (PKB)

Ask1: apoptózis szignál-regulált kináz 1

BAD: Bcl-2 asszociált halál promóter

ERK: extracelluláris szignál-regulált kináz

FKHR: forkhead homológ rhabdomiosarkóma transzkripciós faktor

GSK-3 $\beta$ : glikogén szintáz kináz-3 $\beta$

I $\kappa$ B: inhibitor  $\kappa$ B

IKK: I $\kappa$ B kináz

iNOS: indukálható NO-szintáz

IRAK1: interleukin-1 receptorhoz kapcsolt kináz 1

IRAK4: interleukin-1 receptorhoz kapcsolt kináz 4

JNK: c-jun N-terminális kináz

LBP: LPS-kötő protein

LPS: lipopoliszaharid

MAPK: mitogén aktivált protein kináz

MKP-1: MAPK foszfatáz -1

MyD88: myeloid differenciációs faktor 88

NAC: N-acetil cisztein

NADPH-oxidase: NADPH-oxidáz

NEMO: NF- $\kappa$ B esszenciális modulátor

NF- $\kappa$ B: nukleáris faktor- $\kappa$ B

P: foszforilált

PARP: poli(ADP)-ribóz polimeráz

p38-MAPK: p38 mitogén aktivált protein kináz

p65: transzkripciós faktor p65 (RelA)

p50: NF-KappaB1

PI3K: foszfatidilinozitol 3 kináz

PTEN: foszfatáz és tenzin homológ

ROS: reaktív oxigén származék

TAB: TAK1 kötő protein

TAK1: transzformáló növekedési faktor  $\beta$  aktivált kináz 1

TBK1: TANK kötő kináz 1

TIRAP: TIR domén tartalmú adaptor fehérje

TLR: Toll-like receptor

TLR4: Toll-like receptor 4

TNF $\alpha$ : tumor nekrosis faktor  $\alpha$

TRAF6: TNF receptorhoz kapcsolt 6. faktor

TRAM: TRIF-kapcsolt adaptor molekula

TRIF: TIR domént tartalmazó IFN- $\beta$ -t indukáló adaptor fehérje

## Bevezetés

Az inflammáció és az oxidatív stressz a két legfontosabb patofiziológiai folyamat, melyek felelősek a kardiovaszkuláris morbiditásért és mortalitásért. Mindkettőben hasonló intracelluláris jelátviteli útvonalak aktiválódnak. Mostanában a vizsgálatok a jelátviteli hálózatok megértésére összpontosítanak, mert ezek potenciális terápiás célpontok lehetnek. A kutatás egy másik fontos iránya, hogy megismerjük a már meglévő hatóanyagok, és új, gyógyszerben használható vegyületek hatását a jelátviteli útvonalakra.

A vörösborok különféle polifenolokban és antocianinokban gazdagok, melyekről korábbi vizsgálatok bebizonyították, hogy jótékony hatásuk van a kardiovaszkuláris betegségek prevenciójára. Ezek a fenolos komponensek erős antioxidáns, neuroprotektív, rákellenes, gyulladáscsökkentő hatással rendelkeznek.

A malvidin és glikozidjai növényi színanyagok, melyek fontos szerepet játszanak a mikrobák és az UV sugárzás elleni védelemben. A malvidin, a polifenolok közé tartozó vegyület, amely más fenolsavakkal, antocianinokkal, flavonoidokkal, trihidroxi sztilbénekkel a vörösbor alapszínét adja. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a mérsékelt vörösbor fogyasztás csökkenti a kardiovaszkuláris morbiditást, mortalitást és jótékony hatással van a krónikus gyulladással járó betegségekre. Ezen kedvező hatásokat a vörösbor polifenol komponenseivel hozták összefüggésbe.

A gyulladással járó válaszreakciók tanulmányozására széles körben alkalmazzák a lipopoliszacharid által stimulált RAW 264.7 makrofág sejteket. LPS indukció hatására ezekben a sejtekben proinflammatorikus transzkripciós faktorok aktiválódnak (NF- $\kappa$ B, AP-1), melyek hatására gyulladással járó markerek, interleukinek (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) és nitrogén-monoxid termelődik. Ezen folyamatok igazolódtak Gram-negatív szepszisben és más gyulladással járó betegségeken is. A bakteriális lipopoliszacharid indukálta gyulladással járó folyamatokban intenzív reaktív oxigén gyök képződést valamint poli (ADP-ribóz) polimeráz (PARP) aktivációt mutattak ki. A nagy mennyiségű reaktív oxigén gyökök számos patológiai folyamatot kiváltásáért felelősek, mint például lipidperoxidáció, fehérje oxidáció, DNS károsodás, valamint aktiválják a mitogén aktiválta protein kinázokat (MAPK) és gyulladással járó transzkripciós faktorokat. Az LPS valószínűleg egyfajta kompenzációs mechanizmusként aktiválja a citoprotektív foszfatidilinozitol 3 kináz (PI3K)-Akt valamint a MAPK foszfatáz (MKP)-1 útvonalakat. Ezek a folyamatok jelentős szerepet játszanak mind a normál

immunválaszban mind a súlyos szepszis és szeptikus sokk során kialakuló többszörös szervkárosodásban.

A leggyakrabban vizsgált polifenol a rezveratrol, melyről feltételezik, hogy potenciális gyulladáscsökkentő, öregedésgátló, rákellenes, valamint kedvező kardiovaszkuláris hatással bíró vegyület. Bár a vörösborban nagy mennyiségben van jelen, biohasznosulása azonban meglehetősen alacsony, ezért feltételezhető, hogy más polifenol komponenseknek is jelentős szerepe lehet a vörösbor kedvező hatásában. Az egyik lehetséges vegyület a malvidin, melynek vörösborbeli koncentrációja százszorosa a rezveratrolénak. A legújabb kutatási eredmények igazolták a malvidin jótékony hatását kardiovaszkuláris betegségekben, azonban kevés adat áll rendelkezésre a malvidin gyulladáscsökkentő hatásáról, valamint az általa befolyásolt jelátviteli útvonalokról. Így munkánk egyik fő célja a malvidin hatásának vizsgálata LPS indukálta RAW 264.7 makrofág sejteken.

Munkánk másik fontos célkitűzése az oxidatív stressz vizsgálata, mely alapvető szerepet játszik a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában és progressziójában. Az ischemia-reperfúziós károsodás az egyik legáltalánosabb folyamat, mely jelentős mennyiségű reaktív oxigén gyök felszabadulásával jár együtt. Az ischemia-reperfúziós károsodás legfontosabb patofiziológias folyamat az akut kardiovaszkuláris események során. Korábbi vizsgálatok széles körben tanulmányoztak számos vegyületet, melyek potenciálisan alkalmasak az ischemia-reperfúziós károsodás kivédésére. Számos bizonyíték van arra, hogy a ROS és a proapoptotikus jelátviteli útvonalak kulcsszerepet játszanak a sejtkárosodásban és sejthalálban.

A posztischemiás-reperfúziós károsodásban a reaktív oxigén gyököknek és az emelkedett intracelluláris  $Ca^{2+}$  szintnek egyaránt fontos szerepe van. Reperfúzió során a reaktív oxigén intermediereknek számos forrása van: xantin-oxidáz, ciklooxygenáz, fagocita aktiváció, mitokondriális légzési lánc. A nagy mennyiségű ROS oxidatív DNS károsodást, DNS lánc törést okoz, mely a nukleáris PARP enzim aktivációját, végső soron  $NAD^+$  és ATP deplációját eredményezi. Mindezen változások a mitokondriális membrán további károsodásához, valamint apoptotikus és nekrotikus sejthalálhoz vezetnek. Ezek alapján feltételezhető, hogy maga a PARP gátlás eredményes lehet a miokardiális infarktus kezelésében.

A különböző jelátviteli útvonalak közül a PI-3K-Akt és a mitogén aktiválta protein kinázokról igazolódott, hogy szerepük lehet a kardioprotekcióban. Az Akt útvonal aktiválódása kulcsszereppel bír, mivel számos downstream szubsztrátot képes foszforilálni, ezáltal inaktiválni a GSK-3 $\beta$ -t, proapoptotikus Bcl-2 családba tartozó BAD fehérjét, kaszpáz 9-et,

forkhead homolog rhabdomioszarkóma transzkripciósi faktort (FKHR). Másrészt aktiválja az NF- $\kappa$ B-t, riboszómális p70 S6 kinázt és az endotheliális nitrogén-monoxid szintázt. Jelen vizsgálatunk célja az volt, hogy összehasonlítsuk egy PARP gátló, egy klinikumban használt  $\beta$ -adrenerg receptor blokkoló és egy  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló hatását a jelátviteli útvonalakra ischemia-reperfúziós modellben.

## **Célkitűzések**

A reaktív oxigén gyökök kulcsszerepet játszanak a szeptikus sokk és az ischemia-reperfúziós károsodások patogenezisében és progressiójában. A ROS és a hozzá kapcsolódó jelátviteli útvonalak tanulmányozása elősegítheti új, potenciális terápiás célpontok meghatározását. Munkánk során két különböző vizsgálati modellben (sejtkultúra, Langendorff szívperfúziós modell) tanulmányoztuk az inflammációban és az oxidatív stresszben központi szerepet játszó jelátviteli útvonalakat. Vizsgáltuk a malvidin hatását gyulladásos válaszra, valamint a Metoprolol, Verapamil és egy PARP gátló hatását ischemia-reperfúzió körülményei között.

- 1. Malvidin antioxidáns/antiinflammatorikus hatásának tanulmányozása**
- 2. Malvidin és a rezveratrol antioxidáns és antiinflammatorikus hatásának összehasonlítása valamint annak meghatározása, hogy a mérsékelt vörösbor fogyasztás jótékony hatása melyik polifenolnak tulajdonítható.**
- 3. A klinikumban használt kardioprotektív  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló és  $\beta$ -adrenerg receptor blokkoló gyógyszerek hatással vannak-e a PI-3K-Akt és a MAPK jelátviteli útvonalakra.**
- 4. PARP gátló,  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló és  $\beta$ -adrenerg receptor blokkoló kardioprotektív hatásának összehasonlítása.**

## Diszkusszió

### *A malvidin antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatása*

Az LPS hatására a citoszolban elhelyezkedő NF- $\kappa$ B nukleáris lokalizációs szignálja szabaddá válik, ennek hatására lehetővé válik a transzkripció faktor magba történő transzlokációja. Az NF- $\kappa$ B a sejtmagban foszforilálódik, acetilálódik, ezáltal aktiválódik és képessé válik arra, hogy a promoter DNS szekvenciához kapcsolódjon. Ezáltal különböző gének expresszálódnak (ábra), mint például proinflammatorikus citokinek, kemokinek, adhéziós fehérjék, COX-2, iNOS génjei. Ezek a folyamatok kiemelkedő jelentőséggel bírnak a gyulladással összefüggő krónikus betegségekben. Vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy a malvidin gátolja az NF- $\kappa$ B foszforilációját, magba történő transzlokációját, és a konszenzus DNS szekvenciához való kötődését. Ezek a kísérleti eredmények összhangban vannak más csoportok eredményeivel. Továbbá kimutattuk, hogy a malvidin sokkal alacsonyabb koncentrációban gátolja az NF- $\kappa$ B aktivációt, mint a trans-rezveratrol. Mindezek bizonyítják, hogy a malvidinnek szerepe lehet a vörösbor jótékony hatásában krónikus gyulladással járó betegségekben. Továbbá ezek az eredmények korrelálnak a 1999-2002 US National Health and Nutrition Examination Survey eredményeivel, miszerint a malvidin fogyasztás mértéke negatív összefüggést mutat a szérumban C-reaktív protein szintjével.

Az LPS kötődése a TLR4 receptorhoz különböző jelátviteli útvonalakon keresztül aktiválja a MAP-kinázokat (ábra), mint például myeloid differenciálódási 88 faktor (MyD)88—interleukin-1 receptor-asszociált kináz (IRAK)—TNF-receptorhoz kapcsolt 6 faktor (TRAF)-6—TGF- $\beta$ -aktivált kináz (TAK) útvonal. Végül a MAP-kinázok a proinflammatorikus transzkripció faktorok aktivációjában játszanak szerepet; NF- $\kappa$ B és AP-1. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a malvidin mindhárom MAPK aktivációját csökkentette, bár a hatás erőssége különböző volt (JNK>p38>>ERK). Specifikus kináz inhibitorok alkalmazásával vizsgáltuk, hogy melyik MAPK hatása szignifikáns. Más vizsgálatok eredményeivel összhangban azt találtuk, hogy a JNK and p38 szelektív gátlása szignifikánsan csökkentette az LPS indukálta NF- $\kappa$ B nukleáris transzlokációját és DNS-hez való kötődését. Emellett az ERK gátlását ebben a tekintetben hatástalannak találtuk. Ezen

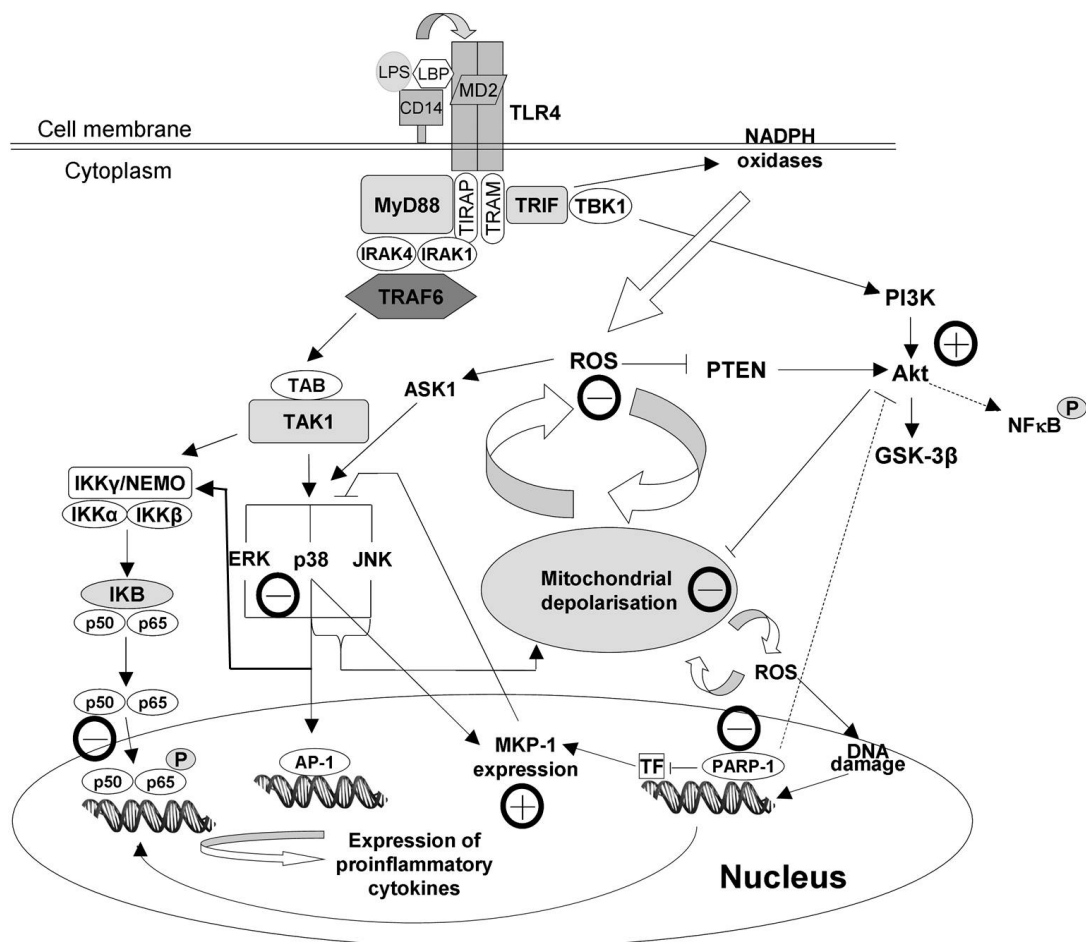
adatok megerősítik, hogy a korai gyulladási válasz RAW 264.7 makrofágokban, legalábbis részben, a fent említett útvonalakon keresztül mediálódik. Másrészt azt is bizonyítottuk, hogy a malvidin MAPK aktivációt csökkentő hatása valószínűleg indirekt módon valósul meg, mivel *in vitro* kináz assay vizsgálat során a malvidinnek nem volt hatása. Legvalószínűbb, hogy a malvidin a MAPK aktivációt csökkentő hatását más gátló mechanizmusok útján (ROS gátlás) fejtik ki. MKP-1 (MAP kináz foszfatáz-1) az egyik legfontosabb enzim, mely a MAP-kinázok defoszforilálás útján történő inaktiválásáért felelős. Ez a gátlás fontos lépése a jelátviteli útvonalak szabályozásának a gyulladási válaszban, mely által a proinflammatorikus citokinek excesszív termelődése *in vitro* and *in vivo* gátlódik. Korábbi eredményekkel összhangban vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az LPS indukálta makrofágokban fokozott MKP-1 génexpresszió és fehérjeszintézis figyelhető meg. Mindezek mellett a fokozott MKP-1 aktiváció nem volt képes teljes mértékben kivédeni a MAPK útvonalak aktivációját. A malvidin mind a stimulált, mind a stimulálatlan makrofág sejtekben fokozta az MKP-1 expresszióját, mely végső soron MAPK aktiváció csökkenéséhez vezetett. Feltételezhető, hogy a malvidin hatására kialakuló MKP-1 expresszió ellenregulálja a TLR4 mediált aktivációs mechanizmusokat (ábra). Vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a malvidin különböző mértékben csökkentette a különböző MAP-kinázok aktivációját LPS hatására, ezen különbségek mutatkoztak a MAPK inhibitorok alkalmazása során. Mindezen adatok azt mutatják, hogy a MAP-kinázok aktivációja/gátlása egy bonyolult hálózat, melyben megfelelő egyensúly elérése kinázonként különböző.

Korábbi vizsgálatok *in vitro* igazolták a malvidin antioxidáns hatását. Ezekkel a vizsgálatokkal összhangban kimutattuk, hogy a malvidin csökkentette az LPS indukálta ROS termelést RAW264.7 makrofágokban és a hatáserőssége az IC<sub>50</sub> érték alapján hasonló a transzveratrolhoz. A ROS mennyiségének csökkentése az általa befolyásolt folyamatok bonyolult hálózatát fogja módosítani, beleértve a mitokondriális integritást, MAPK, Akt, PARP aktivációt (ábra). Nagyon valószínű, hogy az LPS indukálta NF- $\kappa$ B aktiváció a mi kísérleti modellünkben a TLR4-NADPH oxidáz-ROS-PARP útvonalon keresztül mediálódott. A folyamat komplexitása miatt nehéz különbséget tenni ok és okozat között és pontosan azonosítani az upstream és downstream regulátorokat. Mindazonáltal valószínű, hogy a malvidin az antioxidáns tulajdonságánál fogva csökkenti a ROS termelést, ezáltal a PARP és MAPK aktivációt, csakúgy, mint az MKP-1 károsodását. A csökkent PARP aktiváció csökkent NF- $\kappa$ B és MAPK aktivációt eredményez, emellett emelkedett MKP-1 expresszió, valamint PI3K–Akt aktiváció figyelhető meg, melyek együttesen a mitokondriális membrán



integritás megtartásához vezetnek (ábra). A kísérleteink során tehát azt találtuk, hogy malvidin gyulladáscsökkentő hatása az antioxidáns tulajdonságán keresztül valósul meg.

Újabban kimutatták, hogy az Akt downstream célpontja a TRIF/TANK-kötő kináz 1-nek (TBK1) LPS indukálta makrofágokban, mivel a TBK1 fokozza az Akt Ser(473)-on történő foszforilációját. Másrészt az emelkedett ROS aktiválhatja a PI-3K–Akt útvonalat azáltal is, hogy oxidálja és ezáltal inaktiválja a tensin homolog (PTEN)-t. Az Akt aktivációja mitokondriális védelmet eredményezhet azáltal, hogy foszforilálja és inaktiválja a Bad-ot, valamint indirect módon NF-kappaB aktivációt okoz. Az találtuk, hogy a malvidin Akt aktivációt vált ki mind stimulált mind nem stimulált makrofágokban. Legvalószínűbb, hogy ezen hatása az antioxidáns tulajdonságával van összefüggésben. Az LPS indukálta mitokondriális depolarizáció kivédésében a malvidin által kiváltott fokozott Akt aktivációnak lehet leginkább szerepe. Másrészt az Akt foszforilálja és aktiválja az NF- $\kappa$ B p65-t. Vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a PI-3K-Akt útvonal gátlása csökkenti az NF- $\kappa$ B aktivációját, mely azt sugallja, hogy ennek az útvonalnak részben szerepe lehet az LPS hatásának közvetítésében. Ezek az adatok azt mutatják, a malvidin gyulladáscsökkentő hatásában valószínűleg nem az Akt aktivációnak van szerepe.



**Ábra. Malvidin hatása az LPS indukálta patofiziológiai változásokra RAW 264.7 makrofágokban.** A bizonyított hatásokat egyenes vonallal, míg a feltételezett hatásokat/mediátorokat szaggatott vonallal jelöltük. Nyíllal jelöltük az aktivációs folyamatokat, a tompa véggel jelölt vonalak a gátlást reprezentálják. A malvidin pozitív hatását a körben levő + jellel, negative hatását – jellel jelöltük. Az LPS foszforiláció útján aktiválja az NFκB-t, nukleáris transzlokációt és DNS-hez való kötődést eredményez. Indukálja a ROS képződést, PARP és MAPK és Akt aktivációt okoz, fokozza az MKP-1 expresszióját, valamint mitokondriális membrán depolarizációt vált ki. A malvidin csökkenti a ROS képződést, mitokondriális destabilizációt, a PARP valamint a MAPK aktivációt, emellett erősíti az Akt aktivációt, valamint MKP-1 expressziót.

### ***PARP gátló, Ca<sup>2+</sup> antagonist, $\beta$ -adrenerg receptor blokkoló kardioprotektív hatásának összehasonlítása***

Jelen vizsgálatunkban két, az ischemiás szívbetegség kezelésében használt vegyület (Verapamil és Metoprolol) kardioprotektív és jelátviteli útvonalakra (Akt, ERK) kifejtett hatását hasonlítottuk össze. Langendorff szívperfúziós modellben, ischemia-reperfúzió körülményei között hasonlítottuk össze a Verapamil és Metoprolol, valamint egy PARP gátló, a HO-3089, mint pozitív kontroll kardioprotektív hatását.

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy az L-típusú Ca<sup>2+</sup>-csatornák blokkolása különböző ischemiás modellekben védelmet nyújtott a nagy energiájú foszfátvegyületek depléciója ellen, javította a kardiális funkciót, csökkentette az acidózis mértékét, és az infarktus nagyságát. A  $\beta$ -adrenerg receptor blokkolók kardioprotektív hatásának hátterében több mechanizmus állhat, úgy mint, kardiális funkció javítása, lipid peroxidáció csökkentése és a szívizomsejtek apoptózisának gátlása.

Vizsgálatunkban a nagy energiájú foszfátok és az anorganikus foszfát szintjét mértük. Azokat a sziveket, amelyek 15 perces normoxia alatt energetikailag nem voltak stabilak, vagy az ischemia-reperfúziót követően irreverzibilisen károsodtak kizártuk a vizsgálatból. A perfúzió során egyszeri bolus Verapamil és Metoprolol dózist alkalmaztunk. A HO-3089-el történő perfúzió során egy korábbi vizsgálatunkkal már biztosan kardioprotektívnek bizonyult koncentrációt (25 $\mu$ M) választottunk.

Eredményeink alapján igazolódott, hogy a Verapamil és Metoprolol szignifikánsan javította a keratin foszfát és az ATP vissza épülését, javította a pH-t, valamint fokozta az anorganikus foszfát visszaépülését, bár a HO-3089 jobbnak bizonyult. A felsorolt vegyületek szignifikánsan csökkentették a miokardium oxidatív károsodását (csökkent lipid peroxidáció, fehérje oxidáció). A kardiális energetika javulásával párhuzamosan a funkcionális paraméterek javulását észleltük és az infarktus nagysága is szignifikánsan csökkent. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a PARP gátlás kardioprotektív és citoprotektív hatása a PI-3 kináz/Akt útvonalon keresztül valósul meg. Az aktivált Akt foszforilálni képes számos szabályozó fehérjét, mint például a GSK-3 $\beta$ , kaszpáz-9, BAD, és FKHR. A BAD foszforilációja és inaktivációja szerepet játszik a mitokondriális membrán stabilizációjában és gátolja a különböző proapoptotikus fehérjék, mint például a citokróm c és apoptózis indukáló faktor felszabadulását. Emellett az Akt foszforilálni és inaktiválni képes a kaszpáz-9-et, blokkolja a citokróm c/Apaf-1/kaspáz-9/kaspáz-3 útvonalat.

Bár az ERK 1/2 főként a növekedési faktor indukálta mitogén szignál és celluláris differenciáció fő jelátviteli útvonala, oxidatív stressz körülményei közötti protektív szerepe is igazolódott. Ezen hatása az apoptózis gátlásán keresztül valósul meg a c-jun N-terminális kináz (JNK) és kaszpáz-3 gátlása útján. Feltehetően az ERK felelős az elnyújtott citoprotekcióért, mivel az ischemia-reperfúziós károsodások után elnyújtott aktivációját figyelték meg.

Annak igazolására, hogy a Verapamil és Metoprolol citoprotektív hatással bír, vizsgáltuk ezen vegyületek hatását az Akt és ERK 1/2 foszforilációjára ischemia-reperfúzió során. Emellett vizsgáltuk az Akt downstream targetjének a GSK-3 $\beta$ -nak a foszforilációját is. Normoxia és ischemia-reperfúzió során is fokozott Akt és ERK1/2 aktivációt találtunk. Szoros korrelációt találtunk a kreatin-foszfát vissztérése és az Akt, ERK2 aktivitása között. Vizsgálatunkkal bizonyítottuk, hogy az Akt és az ERK2 aktivációja központi szerepet játszik a Verapamil és Metoprolol által közvetített hatásban. Számos korábbi vizsgálat bizonyította, hogy a  $\beta$ -adrenerg receptor blokkolók indukálni képesek a  $\beta$ -arrestin-mediálta epidermális növekedési faktor receptor aktivációt, mely ERK aktivációhoz vezet. Hasonló mechanizmus igazolódott a  $\beta$ -arrestin-1, insulin-like growth factor 1 és az Akt aktiváció között. Az L-típusú Ca<sup>2+</sup>-csatorna blokkolók és az Akt, ERK aktiváció közötti kapcsolat kevésbé egyértelmű, kalmodulin függő ciklikus nukleotid foszfodiészteráz játszhat szerepet a ciklikus nukleotid - Ca<sup>2+</sup> függő/ Ca<sup>2+</sup> független jelátviteli útvonalban.

Annak bizonyítására, hogy a  $\beta$ -adrenerg receptor blokkoló és Ca<sup>2+</sup>-csatorna blokkoló kardioprotektív hatása az Akt és ERK útvonalon keresztül mediálódik, ezen kinázok specifikus upstream targetjeinek inhibitorait használtunk. Az Akt és ERK specifikus gátlása szignifikánsan csökkentette a nagy energiájú foszfátvegyületek visszatérését mind a PARP gátló, mind a Verapamil and Metoprolol esetében is.

## **Konklúzió**

Az iszkémiás szívbetegség és a szepszis világszerte vezető morbiditási és mortalitási tényezők. Az oxidatív stressz és a gyulladás mindkettő esetén fontos szerepet játszik. Terápiás célpontokat keresve vizsgáltuk a természetben előforduló polifenol, a malvidin, valamint két, a klinikumban használt vegyület a Metoprolol és Verapamil hatását ezen folyamatokban. Főként a jelátviteli útvonalakban betöltött szerepükre voltunk kíváncsiak.

A vörösborban található malvidin hatásait összegezve elmondható, hogy fokozza az LPS indukálta Akt és MKP-1 aktivációt, csökkenti a mitokondriális destabilizációt, a ROS termelést, PARP és MAPK aktivációt, végül pedig az NF $\kappa$ B aktivációt. Ezek az adatok azt bizonyítják, hogy a malvidin szignifikáns antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatással bír és legalábbis részben szerepe van a mérsékelt vörösbor fogyasztás jótékony hatásában gyulladás mediálta krónikus betegségekben, obesitásban, diabéteszben, hipertóniában és kardiovaszkuláris betegségekben.

Először írtuk le, hogy a PI-3K-Akt és ERK1/2 útvonalak szignifikáns szerepet játszanak a Ca<sup>2+</sup>-csatorna blokkoló és a  $\beta$ -adrenerg receptor blokkoló kardioprotektív hatásának közvetítésében. Továbbá szoros korrelációt találtunk ezen vegyületek kardioprotektív és kináz aktiváló képessége között, mely adatok arra utalnak, hogy az Akt és ERK1/2 az iszkémiás szívbetegség kezelésének potenciális célpontja lehet.

## Eredményeink

1. Bebizonyítottuk, hogy a vörösborban nagy mennyiségben előforduló malvidin fokozza az LPS indukálta Akt és MKP-1 aktivációt, csökkenti a mitokondriális destabilizációt, a ROS termelést, PARP és MAPK aktivációt, végül pedig az NFκB aktivációt.
2. Azt találtuk, hogy a malvidin gyulladáscsökkentő hatása meghaladja a rezveratrolét. Elsőként írtuk le, hogy a malvidin a rezveratrolnál jelentősebb szerepet játszik a mérsékelt vörösbor fogyasztás jótékony hatásában gyulladás mediálta krónikus betegségekben, obezításban, diabéteszben, hipertóniában és kardiovaszkuláris betegségekben.
3. Először írtuk le, hogy a PI-3K-Akt és ERK1/2 útvonalak szignifikáns szerepet játszanak a  $Ca^{2+}$ -csatorna blokkoló és a  $\beta$ -adrenerg receptor blokkoló kardioprotektív hatásának közvetítésében.
4. Azt találtuk, hogy a PARP gátlás kardioprotektív hatása meghaladja a  $Ca^{2+}$ -csatorna blokkoló és a  $\beta$ -adrenerg receptor blokkoló kardioprotektív hatását, ami alapján a PARP gátlásnak szerepe lehet a kardiovaszkuláris betegségek kezelésében.
5. Továbbá szoros korrelációt találtunk ezen vegyületek kardioprotektív és kináz aktiváló képessége között, mely adatok arra utalnak, hogy az Akt és ERK1/2 az iszkémiás szívbetegség kezelésének potenciális célpontja lehet.

## **Köszönetnyilvánítás**

Ez a tanulmány a PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében készült.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Sümegei Balázs és Dr. Gallyas Ferenc Professzor uraknak, hogy támogattak a munkámban és lehetőséget adtak arra, hogy a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben dolgozhassak.

Szeretném megköszönni Dr. Bock-Marquette Ildikónak a kézirat elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönet a cikkben résztvevő munkatársaknak, mindazoknak, akik segítséget nyújtottak a kísérletes munka elvégzésében, PhD hallgatóknak, asszisztenseknek. Köszönöm támogatásukat, hasznos tanácsaikat és a laborban uralkodó baráti légkört.

Végül, de nem utolsó sorban szívből köszönöm családomnak a kitartó támogatást.

Munánkat a SROP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0002, SROP-4.2.2/B-10/1-2010-0029, OTKA K73738 és a 34039/KA-OTKA/11-06, valamint az ETT 531/2006 támogatta.

