

Egyetemi Doktori (Ph.D) Értekezés Tézisei

**Az adenozin makrofágokat deaktiváló
hatásának intracelluláris mechanizmusa**

Dr. Németh Zoltán

**DEBRECENI EGYETEM
Orvos- és Egészségtudományi Centrum**

és

New Jersey Orvosi és Fogorvostudományi Egyeteme

2004

Az adenzin makrofágokat deaktiváló hatásának intracelluláris mechanizmusai

Dr. Németh Zoltán

Bevezetés

Az adenzin, mint endogén purin nukleozid, a sejtekből történő felszabadulását illetve az extracelluláris térben történő képződését követően a környező sejtek öt felismerő speciális sejtfelszíni struktúráihoz kötődik, amiket adenzin-receptoroknak nevezünk. Az a gondolat, hogy az adenzin szabályozó molekulaként funkcionálhat, Szentgyörgyi Alberttől és kollégáitól származik, akik azt találták, hogy a szívizomból kivont adenzin kifejezett biológiai hatásokkal bír, mivel képes például szív megállást és artéria kitágulást előidézni. Alapvetően két különböző mechanizmussal fejti ki hatását az adenzin. Az első, a közvetlen gátló effektus a sejtfunkciókra, úgymint a negatív inotropikus hatás a szívizomra, az idegsejtaktiváció és az ingerületátvitel gátlása a központi idegrendszerben. Másodsorban, az adenzin közvetett módon védő hatást fejt ki a szövetekre azzal, hogy kedvezőbb környezetet szolgáltat a parenchimás sejtek számára, amire a legjobb példa, hogy értágulat okozásával javítja a tápanyagok elérhetőségét a szövetek számára.

Hypoxia vagy ischemia által metabolikus stressznek kitett immunszervek képesek felszabadítani adenzint, akár nagy fokális koncentraciókban is magukból az immunsejtekből. Ezenkívül specifikus immunstimulusok, mint például baktériumok egyes részei is képesek az immunsejtekből történő adenzin felszabadulást elindítani.

Molekuláris, biokémiai és gyógyszeres jellemzőik alapján az adozin-receptorok négy alcsoportba sorolhatóak. Ezek az alábbiak: A₁, A_{2a}, A_{2b}, és A₃ adozin-receptorok. Ezen receptorokhoz kötődve az adozin képes az egyik legfontosabb immunsejttípus, a makrofágok szinte valamennyi sejtfunkcióját befolyásolni.

Célkitűzések

- 1.** Megvizsgálni, hogy az adozin-receptor izgalom gátolja-e a bakteriális lipopoliszachariddal stimulált RAW 264.7 makrofágok TNF- α termelését.
- 2.** Tanulmányozni, hogy az adozin-receptorok izgatásának van-e valamilyen hatása a sejten belüli TNF- α szintekre a bakteriális lipopoliszacharid által stimulált RAW 264.7 makrofágokban.
- 3.** Meghatározni, hogy vajon az IL-10 produkció befolyásolható-e az adozin-receptorok agonizmusával a bakteriális lipopoliszachariddal stimulált RAW 264.7 makrofágokban.
- 4.** Megvizsgálni, hogy az adozin-receptor izgalomnak van-e valamilyen hatása az NF- κ B transzkripciós-faktor rendszerre lipopoliszacharid által stimulált RAW 264.7 makrofágokban.

5. Tanulmányozni az adenzin-receptor agonizmus hatását a CREB transzkripciós-faktor rendszerre lipopoliszacharid által stimulált RAW 264.7 makrofágokban.
6. Megvizsgálni különböző gének kifejeződésének pontosabban mRNS-re történő átíródásának változását adenzin kezelés hatására bakteriális lipopoliszachariddal stimulált RAW 264.7 makrofágokban.

Módszerek

1. TNF- α és IL-10 protein szintek meghatározása ELISA technikával sejtfelülűszókból és a TNF- α esetében sejt kivonatokból
2. A citokin-gének mRNS-einek átírásában kulcsfontosságú transzkripciós faktorok (NF- κ B és CREB) vizsgálata EMSA “gélshift” illetve “supershift” technikával
3. Átmeneti sejtranszfekció és luciferáz enzimaktivitás mérése
4. A gátló κ B (I κ B) és a p65 proteinek Western blot analízise
5. A foszforilált-CREB, a foszforilált-p38, és a foszforilált-p42/44 proteinek Western blot analízise
6. RT-PCR és Affymetrix “gene chip” vagy “microarray” analízis

Eredmények

1. Az adenzin-receptor agonizmus csökkenti a TNF- α szekréciját és a sejten belüli TNF- α szinteket az LPS-szel kezelt RAW 264.7 makrofágokban.

A sejtek 4 órán keresztül tartó LPS kezelése TNF- α szekrécit indukált, ami ELISA-val mérhető volt a sejtfelülúszókból. 30 perccel az LPS stimuláció előtt végzett adenzin kezelés (10-100 μ M) koncentráció-függő módon csökkentette a TNF- α termelődését. Az összes általunk vizsgált különböző adenzin-receptor agonista, mint pl. CPA, CCPA, CGS-21680, NECA, és IB-MECA ezzel megegyező hatást fejtett ki.

Ezekután tanulmányoztuk, hogy vajon a sejten kívüli TNF- α szintek csökkenése a sejten belüli TNF- α termelődés megakadályozása avagy a szekréción folyamat gátlása révén következett-e be. Azt találtuk, hogy az adenzin előkezelés gátolta az intracelluláris TNF- α megjelenését, de nem volt hatással a szekréción folyamatokra.

2. Az adenzinnak nincs hatása az NF- κ B transzkripción-rendszer aktiválódásában RAW 264.7 makrofágokban.

LPS-stimulációt követően RAW 264.7 makrofágok sejtmagkivonatát használva EMSA technikával a NF- κ B transzkripción-faktor DNS-hez kötődését

észleltük, amit az adenzin előkezelés nem befolyásolt. Az EMSA technikán kívül, Western blot analízissel is megerősítettük, hogy az adenzin nem gátolta meg a p65 protein megjelenését a sejtmagban, amely az NF- κ B transzkripciós-faktor rendszer indukciójának nélkülözhetetlen része. Továbbá az adenzin kezelés nem befolyásolta a gátló I κ B protein lebomlását.

3. Az adenzin nincs hatással az LPS által indukált NF- κ B-függő géntranszkripcióra.

Annak a lehetősége még mindig fenállt, hogy az adenzin esetleg meg tudja akadályozni az NF- κ B-függő géntranszkripciót, annak ellenére, hogy az NF- κ B proteinnek a DNS-hez történő kötődését nem gátolta. Hogy megvizsgáljuk ezt a feltételezést, a sejteket átmenetileg transzfektáltuk egy NF- κ B-luciferáz reporter vektorral. Ezt követően pedig adenzin vagy kontrol előkezelést alkalmazva stimuláltuk a transzfektált sejteket LPS-szel, majd a géntranszkripció mértékét a luciferáz aktivitás változásával mértük. Azt találtuk, hogy hasonlóan az EMSA technikával kapott eredményhez, az adenzin nem befolyásolta az NF- κ B-függő géntranszkripciót.

4. Az adenzin előkezelés fokozza az IL-10 termelődését az LPS által stimulált RAW 264.7 makrofágokban.

Az IL-10-et eredetileg a (Th)2-és sejtek által termelt citokinként írták le. Az utóbbi időkben kiderült azonban, hogy a monociták és a makrofágok a legfőbb forrásai a vérkeringésben megtalálható IL-10-nek, ami képes egyéb citokinek termelődését gátolni és ilyen módon általános gyulladáscsökkentő hatást kifejteni. Miután már korábbi tanulmányainkban láttuk, hogy az adenzin egyértelműen gyulladást mérséklő hatást fejt ki, ezért megvizsgáltuk, hogy milyen módon befolyásolja a gyulladáscsökkentő jellemzőkkel rendelkező IL-10 termelődését. Azt találtuk, hogy az adenzin kezelés megemelte az LPS-szel stimulált RAW 264.7 makrofágok által termelt IL-10 citokin szintjét.

5. Az adenzin fokozza a CREB-függő géntranszkripciót.

Mivel az IL-10 termelődését fokozza a CREB transzkripció faktor aktiválódása, ezért a következő lépésben megvizsgáltuk, vajon az adenzin képes-e befolyásolni ezen transzkripció faktor indukcióját. A CREB-luciferáz vektorral transzfektált RAW 264.7 sejtekben azt találtunk, hogy az adenzin koncentráció-dependens (10-100 μM) módon emelte a CREB-függő géntranszkripciót. A következő kísérletsorozatban azt vizsgáltuk meg, hogy ez a megemelkedett géntranszkripció a következménye volt-e a fokozott CREB-DNS kötődésnek. Ennek meghatározása érdekében a sejteket 100 μM adenzinnal kezeltük 0, 30 és 90 percig, majd ezen sejtek sejtmagkivonatából gélshiftet csináltunk. Ezen

technikával a CREB-DNS kötődés mintázatában nem sikerült változást kimutatni az idő függvényében.

6. Az adenzin indukálja a CREB foszforilációját.

Mivel az adenzin nem változtatta meg a CREB-DNS kötődést, ezért a CREB-függő géntranszkripcióra a következő magyarázat a foszforiláció révén történt CREB aktiváció lehetett. Ezen feltételezés alapját képezte az a tény, hogy a fokozott géntranszkripció a CREB esetében annak foszforilációja révén indukálódik. Ezt követően kísérleteink azt mutatták, hogy 30 perces adenzin kezelés után a CREB protein foszforilációja következik be a Ser133-as pozícióban.

Mivel az extracelluláris adenzinról kimutatták, hogy aktiválja mind a p38, mind a p42/44 proteint, továbbá az is ismert, hogy ezek a mitogén-aktivált kinázok közvetítők az extracelluláris stimulusokat követő CREB indukciónak. Ezért a következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a p38 vagy a p42/44 részese volt-e az adenzin CREB-et aktiváló hatásának.

Western blot metodikával és speciális antitestek használatával, amelyek csak az aktivált, duplán foszforilált formáját ismerik fel a p38-nak illetve a p42/44-nek, azt találtuk, hogy az adenzin 100 μ M-os koncentrációban mindkét protein (kináz) foszforilációját illetve aktiválódását idézi elő.

Utolsó lépésként funkcionális farmakológiai evidenciát találtunk arra, hogy a szelektív p38 inhibitor gátolta az adenzin által indukált CREB-függő géntranszkripciót. Ugyanakkor megemlítendő, hogy a szelektív p42/44 gátlószer nem volt képes hasonló hatást elérni.

7. A géntranszkripció analízise adenzinnal és/vagy LPS-szel kezelt RAW 264.7 sejtekben.

3 órás LPS kezelés után 98 gén transzkripciója több mint 2-szeres emelkedést mutatott, míg 32 másik génnél több mint 2-szeres csökkenést tapasztaltunk. Az adenzin kezelés az LPS által indukált gének egyikének a transzkripcióját sem változtatta meg másfelszerésnél nagyobb mértékben. Továbbá az adenzin kezelés önmagában, LPS stimulus nélkül nem változtatta meg a különböző gének átíródását.

8. A TNF- α és az A_{2b} adenzin-receptor génátíródásának RT-PCR analízise.

A "microarray" eredményét az RT-PCR analízis megerősítette, amikor azt találtuk, hogy a TNF- α mRNA transzkripciója indukálódott LPS stimulus hatására, amit az adenzin kezelés nem befolyásolt. Ezzel megegyező eredményt kaptunk az A_{2b} receptor mRNS-ének átíródása esetén RAW sejtekben.

Következtetések

Megvizsgáltuk annak a lehetőségét, hogy az adenzin-receptor agonizmus citokinek termelődését szabályozó hatását vajon az NF- κ B és/vagy a CREB transzkripciós faktoron keresztül fejt-e ki. Bár az adenzin-receptor stimuláció gátolja mind az extracelluláris, mind az intracelluláris TNF- α produkciót, ami NF- κ B-függő hatásmechanizmusra utal, adataink mégis azt mutatják, hogy az adenzin nincs hatással erre a transzkripciós faktorra. Három különböző tudományos bizonyítékot találtunk, amelyek mind ezt igazolják. Először, sem az adenzin, sem az adenzin-receptor agonisták sorozata nem befolyásolta az NF- κ B kötődését a DNS-hez. Másodszor, az adenzin nem módosította az NF- κ B által indukált luciferáz promoter aktivitást. Végül, az átfogó géntanszkripció analízis a nagyjából 12 ezer gént magábafooglaló un. “cDNA microarray” technikával azt mutatta, hogy bár az LPS stimuláció számos gén transzkripcióját indukálta, az adenzin nem befolyásolta ezt a folyamatot.

Habár ezek az eredmények az adenzin NF- κ B-függő transzkripciót szabályozó szerepe ellen szólnak, vannak olyan kérdések, amelyek további megvitatást érdemelnek. Először, a géntanszkripció vizsgálata csak egy időpontban, nevezetesen 3 óránál történt, ami nem zárja ki azt, hogy az adenzinnak esetleg egy másik időpontban van hatása erre a folyamatra.

Másodszor, habár maga az adenzin nincs hatással a citokinek mRNS szintjeire modellünkben, az LPS által stimulált RAW 264.7 makrofágokban, az A₃ adenzin-receptor agonista IB-MECA-t használva azt találtuk, hogy a MIP-1 α mRNS szintjei csökkentek az említett szelektív agonista hatására. Mivel az adenzin maga egy viszonylag gyenge A₃ receptor izgató, ezért elképzelhető, hogy egy kifejezett és célzott A₃ receptor stimuláció képes csökkenteni a citokinek mRNS szintjeit.

A hatásmechanizmus, amellyel az adenzin deaktiválja a makrofágokat mind a mai napig nem teljesen egyértelmű. Egy friss tanulmányban Sajjadi és munkatársai azt mutatták ki, hogy az adenzin csökkentette a TNF- α mRNS-ének a szintjét egy LPS által stimulált emberi monocita sejtvonalban, ami ellentétés azzal, amit mi találtunk egér makrofág sejtekben LPS stimuláció után, nevezetesen, hogy az adenzin nem befolyásolta a TNF- α mRNS-ének az akkumulációját. Mindazonáltal a TNF- α mRNS-ének említett csökkenése az emberi monocitákban az NF- κ B aktiváció csökkenése nélkül következett be.

Másrésről, úgy tűnik, hogy bizonyos körülmények között az adenzin képes gátolni a NF- κ B-függő géntranszkripciót. Például, myeloid sejtekben és limfocitákban, illetve epithel sejtekben is az adenzin gátolja az NF- κ B aktivációt. Mindent összevetve, további kutatómunkára van szükség annak kiderítése érdekében, hogy milyen mechanizmussal fejti ki gyulladáscsökkentő hatását az adenzin. Azt is fontos kiemelni, hogy jelenleg nem világos, melyik adenzin-

receptoron keresztül fejtette ki az adenzin a hatását, amelynek eredményeként csökkent a TNF- α protein szintje.

Az NF- κ B-n kívül megvizsgáltuk az adenzin lehetséges hatásait egy másik, a citokin válaszok szabályozása szempontjából fontos transzkripciós rendszerre, a CREB-re. Adataink első alkalommal szolgálnak bizonyítékul arra, hogy az adenzin aktiválja a CREB transzkripciós rendszert. Tehát a makrofágok is hozzáadhatóak ahhoz az egyre növekvő listához, amely azokat a sejttípusokat (endotél, epitel, simaizom, harántcsíkolt izom, idegsejt) említi, amelyekben az adenzin-receptor izgalom a CREB transzkripciós rendszer indukcióját idézi elő. A CREB transzkripciós rendszer adenzin által előidézett aktivációja a "klasszikus" CREB aktiváció útját követi, ami a Ser133-as csoport foszforilációjával jár anélkül, hogy a DNS-hez történő CREB kötődés megváltozna.

Ehhez kapcsolódóan a másik fontos és új adatunk az, hogy az adenzin indukálja a szignálátvivő protein kinázok közül a két legfontosabbat, a p38-at és a p42/44-et. Ezen kinázok közül a p38 közvetlenül hozzájárul az adenzin által megnövelt CREB-függő transzkripcióhoz, mivel a p38-as szignálátvitel farmakológias gátlása csökkenti az adenzin által indukált CREB aktivációt.

Jelen eredményeink azt az érdekes kérdést vetik fel, hogy melyek azok a gének, amelyeknek átírása indukálódik a CREB aktivációját követően. Egy nagyjából 12 ezer gént tartalmazó úgynevezett "cDNA microarray" technikát

alkalmazva 3 órával az LPS-szel vagy annak controljával kombinált adenzin kezelés után nem találtunk olyan géneket, amelyeknek transzkripciója az adenzin által indukálódott volna. Erre egy nagyon nyilvánvaló magyarázat lehet, hogy az adott időpontra a CREB által indukált gének mRNS válaszai már lecsengtek. Ezt a lehetőséget támasztja alá az az általános megfigyelés, hogy az extracelluláris stimulusokra adott CREB aktiváció nagyon gyors, és az általa indukált gének mRNS válaszai 3-4 óra alatt lecsillapodnak.

Egy további lehetséges magyarázat, hogy a CREB aktiváció önmagában nem elegendő a gének mRNS-re történő átírásának a beindításához. Azt is ki kell emelnünk, hogy a tipikusan CREB-függő IL-10 protein szintjei magasabbak voltak az adenzin kezelés hatására, bár a "microarray" analízis nem mutatott a mRNS szintjén emelkedést, ami nem volt teljesen váratlan. Ugyanis az közismert tény, hogy az IL-10 mRNS-e nagyon nehezen detektálható, egyrészt a kevésszámú mRNS másolat miatt, másrészt a késleltett, időben elhúzott mRNS-válasz miatt. Összefoglalva, további kísérletek szükségesek az adenzin által fokozott IL-10 produkció hátterében álló intracelluláris mechanizmusok feltárásához.

Összefoglalás

Az adenzin makrofágokra kifejtett összetett hatásának végső eredménye egy deaktivált, gyulladáscsökkentő makrofág-fenotípus kifejlődése. Mindazonáltal ennek a gyulladáscsökkentő hatásnak a részletei még nem teljesen tisztázottak. Bár az valószínű, hogy az adenzin-receptorok aktiválódása egy közös és fontos, sejten belüli szabályozó mechanizmust befolyásolva fejt ki általános gyulladáscsökkentő hatását a makrofágokban, ez a támadáspont egyelőre nem ismert.

Azon feltételezésünk, hogy az NF- κ B, mint az LPS hatását közvetítő központi transzkripciós faktor lehetne a támadáspontja az adenzin hatásának, nem igazolódott be. Mivel sem magára az adott transzkripciós faktorra, sem pedig az általa indukált citokinek RNS-ére nem volt hatással az adenzin. Ez azt a hipotézist támogatja, hogy az adenzin citokinekre kifejtett hatásának egyik támadáspontja az RNS-mintáról történő protein-átíródás szintjén lehet.

Ugyanakkor adataink azt is bizonyítják, hogy az adenzin aktiválja a CREB transzkripciós rendszert, ami részben magyarázattal szolgálhat az adenzin hatására történő makrofág-fenotípus változásra. Továbbá, mivel mind a p38, mind a p42/44 kináz rendszer központi szerepet játszik az extracelluláris téréből jövő stimulusok közvetítésében a sejten belüli térben, ezen kinázok adenzin általi indukálódása fontos mechanizmus lehet a makrofágok deaktiválódásában bizonyos

körülmények között, mint például keringési zavarok, gyulladás és szepszis esetében. Összefoglalva, további kutatások szükségéek annak felderítése érdekében, hogy az extracelluláris adenzin által indukált sejten belüli szabályozó mechanizmusok miképpen befolyásolják a makrofágok funkcióit.

Köszönetnyilvánítás

- Köszönetemet szeretném kifejezni mindenekelőtt **Dr. Haskó György**-nek, közvetlen tanítómna és legközelibb barátomna, hogy bevezetett a farmakológia és az immunológia rejtelmeibe, hogy újabb és újabb gondolataival, végtelen türelmével, szorgalmával és állandó biztatásával folyamatosan támogatott tudományos karrierem építésében.
- Köszönetet mondok professzoromna, **Dr. Vizi E. Szilveszter**-nek, a Magyar Tudományos Akadémia elnökének, aki példát mutatott számomra, aki fantasztikus iskolát és kiváló tudományos környezetet teremtett mindannyiunk számára az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézetében.
- Köszönöm **Dr. Virág László**-na, aki nemcsak kiváló munkatárs, hanem nagyszerű barát is, hogy alapos tudományos munkájával és lelkesítő hozzáállásával mérhetetlenül sokat segített abban, hogy ez a munka létrejöheszen.

- Köszönettel tartozom **Dr. Szabó Csaba**-nak, aki egy átlagból kiemelkedő kutató és segítőkész barát számomra, amiért rengeteg hasznos tanáccsal látott el a kísérletek tervezésében és az eredmények értelmezésében.

Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

Nemzetközi szaklapokban:

1. Haskó G, Szabó C, Németh ZH, Kvetan V, Pastores SM, and Vizi ES. (1996) Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- α , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol* 157:4634-4640.
2. Sperlág B, Haskó G, Németh Z, and Vizi ES. (1998) ATP released by LPS increases nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cell line via P2z/P2x7 receptors. *Neurochem Int* 33:209-215.
3. Haskó G, Németh ZH, Vizi ES, Salzman AL, and Szabó C. (1998) An agonist of adenosine A₃ receptors decreases interleukin-12 and interferon-gamma production and prevents lethality in endotoxemic mice. *Eur J Pharmacol* 358:261-268.

4. Haskó G, Kuhel DG, **Németh ZH**, Mabley JG, Stachlewitz RF, Virág L, Lohinai Z, Southan GJ, Salzman AL, and Szabó C. (2000) Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a post-transcriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J Immunol* 164:1013-1019.
5. Marton A, Pacher P, Murthy KG, **Németh ZH**, Haskó G, and Szabó C. (2001) Anti-inflammatory effects of inosine in human monocytes, neutrophils and epithelial cells in vitro. *Int J Mol Med* 8:617-621.
6. Haskó G, Deitch EA, Szabó C, **Németh ZH**, and Vizi ES. (2002) Adenosine: a potential mediator of immunosuppression in multiple organ failure. *Curr Opin Pharmacol* 2:440-444.
7. **Németh ZH**, Leibovich SJ, Deitch EA, Vizi ES, Szabó C, and Haskó G. (2003) cDNA microarray analysis reveals a nuclear factor κ B-independent regulation of macrophage function by adenosine. *J Pharmacol Exp Ther* 306:1-8.
8. **Németh ZH**, Leibovich SJ, Deitch EA, Sperlágh B, Virág L, Vizi ES, Szabó C, and Haskó G. (2003) Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 883-888.

Könyvfejezetek:

9. Haskó G, Szabó C, Németh ZH, and Vizi ES. (1997) Modulation of cytokine and nitric oxide production by adrenergic, dopaminergic and adenosine receptor ligands in endotoxemia. In: Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis. Mechanisms and Therapeutic Approaches, *Monduzzi Editore* (Bologna, Italy) (Faist E, ed) 65-69.
10. Szabó C, Haskó G, Németh ZH, Vizi ES, and Salzman AL. (1998) Regulation of nitric oxide and cytokine production by a selective A₃ receptor agonist *in vivo* and *in vitro*. In: The Biology of Nitric Oxide. Vol. 6; *Portland Press*, 244.

Egyéb saját közlemények

Nemzetközi szaklapokban:

11. Szabó C, Haskó G, Zingarelli B, Németh ZH, Salzman AL, Kvetan V, Pastores SM, and Vizi ES. (1997) Isoproterenol regulates TNF, IL-10, IL-6 and nitric oxide production and protects against the development of vascular hyporeactivity in endotoxemia. *Immunology* 90:95-100.
12. Németh ZH, Haskó G, Szabó C, and Vizi ES. (1997) Amrinone and theophylline differentially regulate cytokine and nitric oxide production in endotoxemic mice. *Shock* 7:371-375.

13. Szabó C, Haskó G, **Németh ZH**, and Vizi ES. (1997) Calcium entry blockers increase interleukin-10 production in endotoxemia. *Shock* 7:304-307.
14. Haskó G, **Németh ZH**, Szabó C, Zsilla G, Salzman AL, and Vizi ES. (1998) Isoproterenol inhibits IL-10, TNF- α , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Brain Res Bull* 45:183-187.
15. **Németh ZH**, Szabó C, Haskó G, Salzman AL, and Vizi ES. (1997) Effect of the phosphodiesterase III inhibitor amrinone on cytokine and nitric oxide production in immunostimulated J774.1 macrophages. *Eur J Pharmacol* 339:215-221.
16. Haskó G, Szabó C, **Németh ZH**, Salzman AL, and Vizi ES. (1998) Suppression of interleukin-12 production by phosphodiesterase inhibition in murine endotoxemia is interleukin-10 independent. *Eur J Immunol* 28:468-472.
17. Haskó G, Szabó C, **Németh ZH**, Lendvai B, and Vizi ES. (1998) Modulation by dantrolene of endotoxin-induced interleukin-10, tumor necrosis factor- α , and nitric oxide production *in vivo* and *in vitro*. *Br J Pharmacol* 124:1099-1106.
18. **Németh ZH**, Haskó G, Szabó C, Salzman AL, and Vizi ES. (1998) Calcium channel blockers and dantrolene differentially regulate the production of

- interleukin-12 and interferon- γ in endotoxemic mice. *Brain Res Bull* 46:257-261.
19. Haskó G, Szabó C, Németh ZH, Salzman AL, and Vizi ES. (1998) Stimulation of beta-adrenoceptors inhibits endotoxin-induced IL-12 production in normal and IL-10 deficient mice. *J Neuroimmunol* 88:57-61.
 20. Németh ZH, Haskó G, and Vizi ES. (1998) Pyrrolidine dithiocarbamate augments IL-10, inhibits TNF- α , MIP-1 α , IL-12, and nitric oxide production and protects from the lethal effect of endotoxin. *Shock* 10:49-53.
 21. Haskó G, Shanley TP, Egnaczyk G, Németh ZH, Salzman AL, Vizi ES, and Szabó C. (1998) Exogenous and endogenous catecholamines inhibit the production of macrophage inflammatory protein (MIP) 1 α via a β adrenoceptor mediated mechanism. *Br J Pharmacol* 125:1297-1303.
 22. Vizi ES, Haskó G, Németh ZH, Papp Z, and Szelényi J. (2001) Enhanced TNF- α - and decreased IL-10-specific immune responses to LPS during the third trimester of pregnancy. *J Endocrinol* 171:357-363.
 23. Németh ZH, Deitch EA, Szabó C, and Haskó G. (2001) Inhibition of the Na⁺/H⁺ suppresses IL-12 p40 production by mouse macrophages. *Biochem Biophys Acta* 1539:233-242.
 24. Haskó G, Szabó C, Németh ZH, and Deitch EA. (2001) Sulfasalazine inhibits macrophage activation: inhibitory effects on inducible nitric oxide

- synthase expression, IL-12 production, and major histocompatibility complex II expression. *Immunology* 103:473-478.
25. Haskó G, Szabó C, **Németh ZH**, and Deitch EA. (2002) Dopamine suppresses IL-12 p40 production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages via a β -adrenoceptor-mediated mechanism. *J Neuroimmunol* 122:185-190.
 26. Haskó G, Deitch EA, **Németh ZH**, Kuhel DG, and Szabó C. (2002) Inhibitors of ATP binding cassette transporters suppress interleukin-12 production and major histocompatibility complex II upregulation in macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* 301:103-110.
 27. **Németh ZH**, Deitch EA, Szabó C, Mabley JG, Pacher P, Fekete Z, Hauser CJ, and Haskó G. (2002) Inhibition of the Na^+/H^+ exchanger inhibits the epithelial cell inflammatory response and exerts protective effects in colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G122-133.
 28. **Németh ZH**, Deitch EA, Lu Q, Szabó C, and Haskó G. (2002) NHE blockade inhibits chemokine production and NF- κ B activation in immunostimulated endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C396-C403.
 29. Haskó G, Mabley JG, **Németh ZH**, Pacher P, Deitch EA, and Szabó C. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase is a regulator of chemokine

- production: relevance for the pathogenesis of shock and inflammation. *Mol Med* 8:283-289.
30. **Németh ZH**, Deitch EA, Szabó C, Fekete Z, Hauser CJ, and Haskó G. (2002) Lithium induces NF- κ B activation and IL-8 production in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 277:7713-7719.
 31. **Németh ZH**, Deitch EA, Szabó C, and Haskó G. (2002) Hyperosmotic stress induces nuclear factor- κ B activation and IL-8 production in human intestinal epithelial cells. *Am J Pathol* 161:987-996.
 32. **Németh ZH**, Deitch EA, Szabó C, and Haskó G. (2003) Pyrrolidinedithiocarbamate inhibits NF- κ B activation and IL-8 production in intestinal epithelial cells. *Immunol Lett* 85(1):41-46.
 33. **Németh ZH**, Deitch EA, Davidson MT, Szabó C, Vizi ES, and Haskó G. (2003) Disruption of the actin cytoskeleton results in nuclear factor- κ B activation and inflammatory mediator production in human intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol* 9999:1-11.
 34. **Németh ZH**, Deitch EA, Szabó C, and Haskó G. (2003) Proteasome inhibition activates NF- κ B in a human intestinal epithelial cell line. *Mol Pharmacol* 65(2):342-9.
 35. Davidson MT, Deitch EA, Lu Q, Haskó G, Abungu B, **Németh ZH**, Zaets SB, Gaspers LD, Thomas AP, and Xu DZ. (2003) Trauma-hemorrhagic

shock mesenteric lymph induces endothelial apoptosis that involves both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Ann Surg* in press.

Könyvfejezetek:

36. Haskó G, **Németh ZH**, Szabó C, and Vizi ES. (1997) Anti-inflammatory effects of verapamil and diltiazem in endotoxin-treated mice. In: Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis. Mechanisms and Therapeutic Approaches, *Monduzzi Editore* (Bologna, Italy) (Faist E, ed) 893-896.
37. **Németh ZH**, Haskó G, Szabó C, and Vizi ES. (1997) Effects of amrinone on cytokine and nitric oxide production in immunostimulated macrophages. In: Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis. Mechanisms and Therapeutic Approaches, *Monduzzi Editore* (Bologna, Italy) (Faist E, ed) 989-993.