

Rezveratrol analógok antiinflammatorikus és antiproliferációs hatásának vizsgálata

PhD tézis

Antus Csenge



Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Molekuláris és Celluláris Biokémia Program

Doktori Iskola és Programvezető: Prof. Dr. Sümegi Balázs

Témavezető: Dr. Veres Balázs

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

2016

Rövidítések listája/ Abbreviations

AP-1:	activator protein 1
COX:	cyclooxygenase
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK:	extracellular signal regulated kinase
IKK:	I κ B kinase
I κ B:	inhibitor of kappa B
IL:	interleukin
iNOS:	inducible nitric oxide synthase
IRAK:	interleukin-1 receptor-associated kinase
JNK:	c-Jun N-terminal kinase
LPS:	lipopolysaccharide
MAPK:	mitogen-activated protein kinase
MKP:	MAPK phosphatase
MTT:	3(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MyD88:	myeloid differentiation primary response protein 88
NF κ B:	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NOX:	NADPH oxidase
PG:	prostaglandin
ROS:	reactive oxygen species
SRB:	sulforhodamine B
TAB:	TAK binding protein
TAK:	TGF-beta-activated kinase
TDPA:	3,4',5-trihydroxy-diphenylacetylene
TIRAP:	TIR domain-containing adapter protein
TLR:	Toll like receptor
TNF α :	tumor necrosis factor alpha
TRAF6:	tumor necrosis factor-receptor associated factor 6

Bevezetés

A gyulladás

A gyulladás a magasabbrendű szervezetek fertőzésre, sérülésre, vagy károsodott szöveti működésre adott válasza, melynek célja a fertőző ágens elpusztítása, a károsodás lokalizálása, az eredeti funkciók helyreállítása. Kialakításában elsősorban a veleszületett immunrendszer folyamatai vesznek részt, amelyek azonban később aktiválhatják az adaptív védekező reakciókat is. Általában gyorsan alakul ki, kis helyre koncentrálódik, és a kórokozó eliminálása után rövid idővel, maradandó következmények nélkül meg is szűnik. Bizonyos esetekben (súlyos fertőzés vagy trauma, hibás regulációs mechanizmusok) viszont káros, olykor halálos következményekkel járhat.

Az elmúlt évtized tudományos kutatásainak köszönhetően egyre több bizonyíték lát napvilágot, amely szerint az inflammatorikus folyamatok részt vesznek a fejlett világ egyre nagyobb figyelmet kapó betegségeinek patogenezisében, mint például a rák, a metabolikus szindróma, a 2-es típusú diabétesz, az atheroszklerózis és a neurodegeneratív elváltozások. Ez tovább fokozza az igényt a gyulladásos mechanizmusok pontos megértése és a gyulladást csillapítani képes terápia kifejlesztése iránt.

A tipikus gyulladásos immunválasz négy összetevőre épül: a kiváltó stimulusra, az azt érzékelő szenzorra, a szenzor által indukált inflammatorikus mediátorra és az effektor funkciókat ellátó, a mediátorok által befolyásolt célszövetre. A kiváltó stimulus lehet exogén (mikroorganizmusok, allergének, idegen testek) vagy endogén (károsodott vagy stressznek kitett szövetekből felszabaduló anyagok, nátrium-urát kristályok, oxidált lipoproteinek, az extracelluláris mátrix degradációs termékei). A behatoló mikroorganizmusokat a gazda szervezete az úgynevezett patogén-asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) alapján ismeri fel. A gyulladásos stimulusk a megfelelő szenzoraikon keresztül sejtek által szekretált, vagy plazmaproteinekből kialakuló inflammatorikus mediátorok megjelenését eredményezik. A celluláris mediátorokat főként speciális leukociták (elsősorban a szöveti makrofágok és hízósejtek), kisebb részben a gyulladás által érintett szövet saját sejtjei termelik.

A kezdeti stimulus függvényében a reagáló szenzorok, mediátorok és effektorok különböző kombinációja biztosítja, hogy a veleszületett immunitás keretein belül a kialakuló immunválasz a lehető leghatékonyabb és minél inkább specifikus legyen. Például bakteriális fertőzés esetén a TLR receptorokról induló jelátvitel elsősorban TNF α , IL-6 és PGE2

mediálásával egy jellegzetes antibakteriális immunválaszt alakít ki, ugyanakkor virális infekciót követően az interferonok produkciójával valósul meg a vírusellenes válasz.

A makrofágok szerepe a gyulladás kialakulásában

A szervezetbe behatoló mikroorganizmusok ellen elsőként a veleszületett immunrendszer fagocitáló sejtjei (makrofágok, polimorfonukleáris leukociták) veszik fel a harcot. Ezek a sejtek a csírvonalban kódolt receptoraikkal képesek felismerni a patogén mikroorganizmusokra jellemző mintázatokat. A mononukleáris fagocitarendszert a monociták és a makrofágok alkotják. A monociták a mieloid progenitor sejtekből differenciálódott, vérben keringő, 10-15 µm átmérőjű sejtek. Az érpályából kilépve a monociták makrofágokká érnek, melyek a monocitákhoz képest akár egy nagyságrenddel is nagyobb méretűek lehetnek, és megnő rajtuk az immunrendszeri funkciók betöltéséhez szükséges receptorok expressziója. A természetes és az adaptív immunitás mellett az egészséges szöveti működés fenntartásában is fontos szereppel bírnak: bekebelezik az elhalt sejteket és a behatoló mikrobákat, enzimeket és gyulladásos mediátorokat termelnek. Egyik legfontosabb tulajdonságuk, hogy hivatásos antigénprezentáló sejtként bemutatják a T-sejteknek az idegen antigént, valamint aktiválni is képesek a limfocitákat. Az utóbbi évtized kutatásai alapján azonban az is egyértelmű, hogy a makrofágok nem csak a védekező folyamatok aktiválásában és fenntartásában, hanem azok megfelelő időben történő leállításában is kritikus szereppel rendelkeznek.

Bár a gyulladás fogalma csak a teljes szervezet vagy a szövetek szintjén értelmezhető, mivel a kialakulása az egyes sejtípusok inflammatorikus folyamatainak következménye, az olyan beavatkozásokkal, amelyek a sejtek gyulladásos jelátvitelét gátolják, hatékonyan csökkenthető a gyulladás mértéke. A makrofágok kulcsfontosságú sejtek mind az akut, mind a krónikus gyulladás kialakulásában, ezért a bennük lezajló inflammatorikus aktiváció gátlása megfelelő terápiás stratégia lehet.

A makrofágok gyulladásos jelátviteli folyamatai

A lipopoliszacharid (LPS) a Gram-negatív baktériumok külső membránjában található, komplex szerkezetű endotoxin. Bár kis mennyiségben az osztódó baktériumokból is felszabadul, nagyobb mennyiségben akkor válik hozzáférhetővé, ha a szervezetbe került baktériumok lízis, fagocitózis vagy antibiotikumok hatására szétesnek. Az ilyenkor felszabaduló, nagy dóziséjú LPS a gazda immunfolyamatainak túlzott aktiválása miatt szisztémás gyulladáson és szeptikus sokkon keresztül akár halált is okozhat.

A Gram-negatív bakteriális infekciók leginkább jellemző patogén asszociált molekuláris mintázataként az LPS önmagában is aktiválja a szervezet védekező mechanizmusait, ezért in vitro és in vivo rendszerekben is gyakran használják az inflammatorikus folyamatok modellezésére.

A makrofágok felszínén található TLR4 receptor-komplex LPS kötésének következtében elsőként a MyD88-függő útvonal aktiválódik, ami a MAP kinázok és az NF κ B transzkripciós faktor korai aktivációján keresztül proinflammatorikus citokinek termelését irányítja. A TIRAP adapter kapcsolja a MyD88 fehérjét a TLR4 intracelluláris doménjéhez. A MyD88 ezután magához vonzza az IRAK4-et és az IRAK1-et, az utóbbi aktivációja a TRAF6-tal történő interakcióját eredményezi. A TRAF6 számos fehérje, így önmaga, az IRAK1, és az IKK komplex regulátoros alegységének K63-típusú ubikvitinációját katalizálja. A TRAF6-on található poliubikvitint felismerve tud kötődni a TAB2 és a TAB3, ez vezet a TAK1 aktiválódásához, ami foszforilálja az IKK β -t. A következő lépésben az I κ B foszforilációja megindítja annak K48-poliubikvitin-mediált proteasomális degradációját. Az I κ B gátlása alól felszabaduló NF κ B alegységek a nukleuszba transzlokálódva számos gén fokozott expresszióját idézik elő: az inflammatorikus interleukinek és a TNF α a makrofágokból felszabadulva a gyulladást a szervezet távolabbi részeire is kiterjesztik, a COX-2 enzim által szintetizált arachidonsav-származékok a gyulladással járó fájdalom és láz kialakulását eredményezik, az iNOS enzim által arginin \rightarrow citrullin átalakulás során termelt nitrogén-monoxid a patogén elpusztítását célozza, azonban eközben citotoxikus hatása is lehet. Az útvonal igen fontos leágazásaként a TAK1 és a TPL2 által aktivált MAPK kinázok foszforilálják a p38, JNK és ERK MAP kinázokat, melyek több transzkripciós faktor (NF κ B, AP-1 dimerek) aktiválásával szintén fokozzák az inflammatorikus gének expresszióját. Fontos regulációs mechanizmusként megemlítendő a MAP kinázok MKP-1 általi inaktivációja.

A makrofág aktiváció további jellegzetes folyamata az úgynevezett oxidatív burst, melynek során a sejtek elsősorban a NADPH oxidáz komplex által nagy mennyiségű reaktív oxigén intermediert (ROS) termelnek. A makrofágok fagoszómáiban termelődő ROS a mikrobákkal szembeni védekezés fontos eleme. Ugyanakkor a keletkező szabadgyökök és peroxidok képesek átdiffundálni a membránokon, és így a fagoszómából a citoszólba vagy az extracelluláris térbe kijutva komoly károkat okozhatnak a szövetekben. Gyakorlatilag bármilyen makromolekulával képesek reakcióba lépni, a DNS károsításával mutációkat okozhatnak, a lipidperoxidáció során tönkreteszik a membránokat, a fehérjék aminosav oldalláncainak oxidálása következtében módosítják azok harmadlagos szerkezetét. Ezen

folyamatok eredőjeként az elhúzódó, erőteljes oxidatív stressz a makrofágok és a környező szöveti sejtek apoptózisát vagy nekrozisát okozva súlyos szövetkárosodáshoz vezethet.

A rezveratrol

A rezveratrol egy természetes polifenol, mely gombás fertőzés vagy egyéb környezeti stressz hatására termelődik a növényekben. Nagy koncentrációban megtalálható a szőlőben, és a vörösbor számos kedvező élettani hatásáért tartják felelősnek. Számos kutatási eredmény szerint a rezveratrol segíthet az atheroszklerózis, a rák és különböző gyulladásos betegségek megelőzésében. Gyulladásgátló hatását elsősorban a reaktív oxigén és nitrogén gyökök semlegesítésén, az NF κ B transzkripció faktor és a COX enzimek gátlásán keresztül fejt ki. Ezenfelül a rezveratrol számos molekuláris támadáspontra (protein kinázok, hormon receptorok, ribonukleotid reduktáz, DNS polimeráz) hatva akadályozza a tumoros sejtek proliferációját.

Az utóbbi évtizedben a rezveratrol biológiai hatásának fokozása reményében számos analógot szintetizáltak, melyek kémiai és biológiai vizsgálata segít a sztilbén típusú polifenolok szerkezete és molekuláris hatása közötti összefüggések felismerésében. A legtöbb ilyen tanulmány elsősorban a molekulán található funkciós csoportok szerepére koncentrált, jóval kevesebb ismeret áll rendelkezésünkre magának a sztilbén szénvázának a szerepéről a gyulladásgátló és tumorelles hatások kialakításában.

A kutatás célkitűzései

A rezveratrol egy több mint húsz éve felismert gyulladásgátló és tumorelles hatásokkal rendelkező növényi polifenol. A kedvező élettani hatásainak molekuláris hátterére vonatkozó információk azonban több ponton is hiányosak, vagy ellentmondásosak. Úgyszintén kevésbé ismert a molekula szerkezeti jellemzőinek a szerepe a biológiai hatások kialakításában. Kutatásunk céljai voltak ennek megfelelően:

- A rezveratrol anti-inflammatorikus hatásmechanizmusának további feltárása in vitro, lipopoliszachariddal stimulált egér makrofág modellben.
- Olyan rezveratrol analógok azonosítása, amelyek az eredeti molekulánál hatékonyabban gátolják a makrofágok inflammatorikus folyamatait, vagy különböző típusú tumoros sejtek szaporodását.
- Az ismert szerkezetű analógok és a rezveratrol hatásának összehasonlításával a sztilbén típusú polifenolok biológiai hatásait meghatározó szerkezeti jellemzők jobb megismerése.

Eredmények

I. Paramágneses rezveratrol analógok antiinflammatorikus hatása

Mindegyik vizsgált paramágneses analóg a rezveratrolnál gyengébb antioxidáns

Az analógok antioxidáns tulajdonságának felmérése céljából vizsgáltuk azok hatását LPS-sel stimulált RAW264.7 makrofágok ROS termelésére. 24 órás kezelést követően azt találtuk, hogy - habár mind a 7 alkalmazott analóg képes valamilyen mértékben visszafogni a LPS által indukált szabadgyök generálást - egyikkel sem érhető el olyan nagyfokú hatás, mint a rezveratrollal. Meglehetősen hatékony antioxidáns jelleget mutatott a HO4450 és a HO4409, amelyek 50 μM koncentrációban adva 45, ill. 40 %-kal csökkentették a megemelkedett ROS termelést.

Számos analóg a rezveratrolnál hatékonyabban gátolta az aktivált makrofágok nitrit termelését

24 órás LPS kezelést követően azt találtuk, hogy az LPS által kiváltott nitrit produkciót mind a 8 polifenol koncentráció-függő módon gátolta. Kettő analóg kivételével (HO4427 és HO4486) mindegyik a rezveratrolnál erősebb gátló hatást mutatott. Különösen nagy hatékonyságot láthatunk a HO4408 és a HO4409 molekuláknál, amelyek a megnövekedett nitrítszintet körülbelül 50 %-kal csökkentették.

Három analóg a rezveratrolnál erősebben gátolja az aktivált makrofágok TNF α termelését

A TNF α a makrofágok által termelt egyik legfontosabb pro-inflammatorikus citokin, amely az immunrendszer többi sejtjére hatva felelős a gyulladási folyamatok felerősítéséért. A rezveratrolról régóta ismert, hogy képes gátolni a TNF α szintézisét eredményező folyamatokat. LPS-sel aktivált makrofág modellünkben három olyan analógot sikerült azonosítanunk (HO4409; HO4450; HO4569), amelyek a rezveratrolnál is eredményesebben csökkentik az endotoxin hatására termelődő TNF α mennyiségét.

II. A rezveratrol és a TDPA hatása endotoxinnal aktivált makrofágokra

A TDPA a rezveratrolnál gyengébb antioxidáns

Mivel ismert, hogy a rezveratrol kedvező biológiai hatásainak jelentős része a molekula antioxidáns hatására vezethető vissza, elsőként megvizsgáltuk az analóg gyökfogó kapacitását egy sejtmentes modellben, illetve LPS-sel aktivált RAW 264.7 makrofágokban. Mindkét esetben azt találtuk, hogy a rezveratrol a hármaskötéses analógnál hatékonyabb antioxidánsként működik. Míg 50 μM rezveratrol a 10 μM hidrogén-peroxid és 60 μM Fe²⁺-

EDTA által képzett peroxid gyökök 93 %-át tudta semlegesíteni, a TDPA mindössze 53 %-ot. A makrofágok LPS hatására megnövekedő ROS termelését mindkét polifenol koncentrációfüggő módon csökkentette, de a TDPA hatása itt is jelentősen elmaradt a rezveratrolétól.

A TDPA a rezveratrolnál jobban csökkenti a sejtek MTT-assayben mutatott életképességét

A rezveratról tudjuk, hogy számos tumoros sejtvonalra fejt ki citotoxikus és szaporodásgátló hatást. Mivel a RAW makrofágok is leukémia eredetű sejtek, a két polifenol esetleges citotoxikus hatását MTT assayvel mértük fel. A 100 ng/ml LPS-sel és a polifenolok emelkedő koncentrációival (12,5-100 μ M) 24 órán át kezelt sejtek MTT-redukáló kapacitása alapján elmondható, hogy az LPS kezelés önmagában nem érinti a sejtek életképességét, a polifenolok közül pedig a TDPA a rezveratrolnál jobban csökkenti az életképes sejtek számát. Míg 50 μ M rezveratrol 7 %-kal csökkentette az életképességet, ugyanakkora koncentrációjú TDPA 25 %-kal.

A TDPA a rezveratrolnál sokkal hatékonyabban gátolja az egyik legfontosabb inflammatorikus transzkripciós faktor, az NF κ B aktiválódását LPS hatására

A RAW Blue egy olyan, RAW 264.7 makrofágokból genetikai módosítással kifejlesztett sejtvonal, amely az NF κ B transzkripcionális aktivitásának pontos és elegáns megbecsülését teszi lehetővé. A kromoszómába épített riporter génről az aktivált NF κ B által reguláltan egy médiumba szekretált alkalikus foszfatáz enzim íródik át, amelynek mennyisége a megfelelő szubsztrát hozzáadása után fotometriásan mérhető. Az LPS kezelés hatására nagymértékben fokozódó NF κ B aktivitást a TDPA a rezveratrolnál sokkal hatékonyabban tudta csökkenteni. Az 50 μ M-os polifenol koncentráció mellett kapott értékeket összehasonlítva az látható, hogy míg a rezveratrol nem volt képes szignifikánsan befolyásolni az NF κ B aktivációját, a TDPA 31 %-kal csillapította azt. Ez a különbség – bár igen csekély mértékben – már 5 órás kezelés után is észrevehető volt, amikor a kezelt sejtek életképessége még nem mutatott eltéréseket, akár MTT-vel, akár flow citometriás propidium-jodid/annexinV eljárással vizsgálva.

A TDPA és a rezveratrol védi a mitokondrium membránt az LPS-indukált depolarizációtól

Az LPS általi makrofág aktiváció korai fázisában leírt jelenség a mitokondriumok membránpotenciáljának összeomlása. Kíváncsiak voltunk rá, hogy vajon a vizsgált polifenoljaink képesek-e ezt a káros hatást csillapítani. 50 μ M rezveratrollal vagy TDPA-val előkezelt makrofágokat 100 ng/ml LPS-sel kezeltünk további 30 percig, majd flow citometriás módszerrel vizsgáltuk a mitokondrium membránpotenciál változásait. Míg az LPS

a várt módon kiváltotta a membrán depolarizációját, a rezveratrol és a TDPA egyforma mértékben gátolták a jelenséget.

A TDPA a rezveratrolnál jobban gátolja a makrofágok LPS által indukált citokin termelését

A makrofágok gyulladási folyamatokban mutatott kritikus szerepének egyik legfontosabb momentuma a pro- és antiinflammatorikus hatású citokinek szekretálása. 6 órás kezelést követően megmértük a 100 ng/ml LPS-sel és 100 μ M polifenollal kezelt RAW Blue sejtek által a médimba szekretált IL-1, IL-6 és TNF α mennyiségét. Meglepő módon az IL-1 mennyiségében sem LPS, sem a polifenolok hatására nem láttunk változást. Ugyanakkor az LPS az IL-6 termelést a kontroll szint 5-szörösére, a TNF α -ét 17-szeresére fokozta. Ezt az erőteljes citokin produkciót a TDPA a rezveratrolnál hatékonyabban volt képes gátolni: az IL-6 szintet a LPS-kezelt csoporthoz képest a TDPA 81 %-kal, a rezveratrol 67 %-kal csökkentette. A TNF α szintet a TDPA 82 %-kal csökkentette, szemben a rezveratrol 46 %-os eredményével. Látható, hogy habár mindkét polifenol képes gátolni az aktivált makrofágok proinflammatorikus citokin termelését, a TDPA ebben a tekintetben kiemelkedő hatékonyságot mutat.

A TDPA és a rezveratrol eltérő módon befolyásolják az LPS-sel stimulált makrofágok jelátviteli folyamatait

Azzal a céllal, hogy jobban megértsük a rezveratrol és a TDPA inflammatorikus folyamatokra történő eltérő hatásainak molekuláris hátterét, az LPS-sel és a polifenolokkal kezelt sejtek lizátumaiból western blottal vizsgáltuk a TLR4-NF κ B jelátvitelben résztvevő, legfontosabb jelátviteli fehérjék mennyiségét/aktiváltságának mértékét. Azt találtuk, hogy a rezveratrol és az analógja több ponton is eltérően befolyásolják a szóban forgó szignáltranszdukciós útvonal lépéseit. A TDPA a rezveratrolnál jobban gátolta az IKK, I κ B, és az NF κ B p65 alegységének foszforilációját 30 perces LPS kezelés után, valamint a COX-2 mennyiségét 3 órás kezelést követően. Az ERK foszforilációját a két analóg közel egyforma mértékben gátolta, míg meglepetésünkre a TDPA kifejezetten fokozta a p38 és a JNK fehérjék aktivitását. Az MKP-1 mennyiségét 3 óránál mindkét anyag csökkentette, a TDPA a rezveratrolnál nagyobb mértékben.

III. A rezveratrol és a TDPA citotoxikus és szaporodásgátló hatása különböző tumoros sejtvonalakon

A TDPA a rezveratrolnál hatékonyabban csökkenti különböző eredetű tumoros sejtek MTT assayben mutatott életképességét

Korábbi megfigyeléseink alapján a TDPA a rezveratrolnál hatékonyabban csökkentette RAW makrofágok életképességét MTT assayvel vizsgálva. Annak eldöntésére, hogy ez a jelenség az adott sejttípusra specifikus, vagy más, tumoros sejtvonalakon is megfigyelhető, 6 további sejtvonalat kezeltünk 24 órán át rezveratrollal vagy TDPA-val, majd az élő sejtek arányát MTT teszttel vizsgáltuk. A vizsgálatba bevont sejtvonalak mindegyikéről (RAW 264.7 egér leukémia eredetű makrofág, HepG2: humán hepatocelluláris carcinoma, U251: humán glioblastoma, A549: humán tüdő carcinoma, HeLa: humán cervix carcinoma, PC12: patkány phaeochromocytoma, B16-F10: egér melanoma) elmondható, hogy a TDPA a rezveratrolnál nagyobb mértékben csökkentette az élő sejtek számát.

A TDPA a rezveratrollal azonos mértékben gátolja U251 és HepG2 sejtek kolónia formációját

A kolónia formáció tesztben a 6 lyukú plate-ekre nagyon alacsony sűrűségben (500 sejt/well) kirakott sejteket hét napon át kezeltük a polifenolokkal. A kezelés végén a megfestett sejtkolóniák számából és méretéből következtethetünk a sejtek szaporodásának ütemére. Két humán tumoros sejtvonalon (U251 és HepG2) végzett kísérlet alapján azt láttuk, hogy a kontroll csoporthoz képest mindkét polifenol körülbelül egyforma mértékben gátolta a sejtek szaporodását.

A TDPA a rezveratrolnál nem hatékonyabb a sejtciklus feltartóztatásában

Két humán sejtvonalon (HepG2 és U118) vizsgáltuk a sejtciklus egyes fázisaiba eső sejtek arányát 24 órás polifenol kezelésekre hatására. A flow citometriás méréssel a sejtek DNS-tartalmának meghatározása alapján tudjuk elkülöníteni a különböző fázisban (G0/G1; S; G2/M) lévő sejteket. Az U118 glioblastoma sejtek esetében mindkét polifenol erősen akadályozta az G1→S átmenetet. Ellenben a HepG2 sejteken a rezveratrol és a TDPA sem befolyásolta a G1→S átmenetet, viszont a rezveratrol a TDPA-nál sokkal jobban gátolta az S→G2 fázisok határán történő továbbhaladást.

A rezveratrol és a TDPA azonos mértékben indukálja HepG2 sejtek apoptózisát

A polifenoljaink által indukált apoptózis és nekrozis mértékének megállapítására annexin V/7-AAD jelölést detektáló flow citometriás módszert alkalmaztunk. Az annexinV az apoptózis során igen korán externalizálódó foszfatidil-szerinekhez kötődik, a 7-AAD pedig a

propidium-jodidhoz hasonlóan csak az elhalt sejtekbe képes bejutni. 75 μM -os koncentrációban alkalmazva, 24 órás kezelést követően a két polifenol egyformán, mintegy 14 százalékkal csökkentette az élő sejtek mennyiségét, és növelte elsősorban a korai apoptotikus sejtek arányát. Nekrózis útján elhalt sejtek gyakorlatilag egyik csoportban sem voltak jelen (az arányuk egy ezreléknél alacsonyabb volt).

A TDPA és a rezveratrol egyforma mértékben csökkentik a sejt számot szulforodamin B assay alapján

A korábbi MTT assayben kapott eredményeket szeretnénk volna megerősíteni egy olyan vizsgálattal, amellyel az MTT-vel azonos kezelési paraméterek mellett (azonos sejt szám, plate típus, kezelési idő és koncentrációk) határozható meg a jelenlévő sejtek mennyisége. Erre egy másik életképesség-mérő módszert, a szulforodamin B assayt választottuk. A szulforodamin B megfesti a fehérjét, így mosás és feloldás után az általa adott szín intenzitása arányos a well-ben lévő fehérje mennyiségével. Egy 96 lyukú plate-et két felé osztva kezeltük a HepG2 sejteket a korábbiakhoz hasonló módon, majd 24 óra elteltével a plate egyik felét MTT-vel, a másik felét szulforodamin B-vel festettük meg. Az így kapott életképességi adatokat százalékosan feltüntetve látható, hogy míg az MTT assay a korábbiakkal megegyező módon jelentős eltérést mutat a rezveratrollal illetve TDPA-val kezelt sejtek számában, a szulforodamin B assay alapján a két polifenol teljesen azonos mértékben csökkenti a well-ekben jelenlévő celluláris fehérje mennyiségét. A diagram négy görbéje közül egyértelműen a rezveratrollal kezelt sejtek MTT-görbéje tűnik ki: a másik három görbénél jóval magasabb százalékos életképességi értékeket mutat. A TDPA-hoz tartozó MTT-görbe ellenben gyakorlatilag a TDPA SRB-görbéjével azonos lefutású. A „kezeléseket” ezután az előzőhöz hasonlóan megismételtük, de sejtek nélkül, csak a polifenolok különböző koncentrációjú oldataival, és az MTT/SRB festékekkel. Itt nem találtunk semmilyen eltérést.

A TDPA a rezveratrolnál gyengébb antioxidánsként működik tumoros sejtekben

Végezetül összehasonlítottuk a rezveratrol és a TDPA antioxidáns hatékonyságát HepG2 és U251 sejtekben. 24 órás kezeléseket után mindkét sejtvonalon azt találtuk, hogy a vizsgált koncentráció-tartományban (25-200 μM) a rezveratrol a TDPA-nál magasabb antioxidáns aktivitást mutat. Érdekes módon a glioblastoma sejtekben a TDPA egyáltalán nem működött antioxidánsként, a HepG2 sejtekben viszont igen – igaz, a hatása a rezveratrolétól mintegy 30 %-kal elmaradt.

Összefoglalás

Munkám során egy jól ismert, gyümölcsökben és vörösbortban előforduló polifenol, a rezveratrol szintetikus analógjainak hatását vizsgáltam tumoros sejtvonalakon és LPS által aktivált makrofág sejteken. A kutatás első fázisában nitrogéntartalmú, paramágneses molekulák, a második fázisban pedig egy hármaskötéses rezveratrol származék vizsgálatára került sor. A kísérletek során több analógról bizonyosodott be, hogy az eredeti molekulánál hatékonyabban képes a makrofágok gyulladás során történő aktivációjának csillapítására. Ezek a vegyületek és az általuk nyert, a rezveratrol szerkezet-funkció összefüggésére vonatkozó adatok értékes információkat nyújthatnak új, a polifenolok multi-target jellegét kiaknázó gyógyszerfejlesztések számára.

Kimutattam továbbá, hogy az MTT assay a rezveratrol hatását vizsgáló kutatásokban csak korlátozottan használható, helyette a SRB assayt találtam alkalmasnak a polifenol által okozott sejtszámcsökkentő hatás meghatározására. Figyelembe véve, hogy az in vitro tesztekben máig az MTT assay az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a rezveratrol toxicitásának meghatározására, ez az eredmény nagyban befolyásolja a polifenol hatását taglaló közlemények eredményeinek értelmezését, valamint a jövőben végzendő kísérleteink kivitelezését.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani mindenkinek, aki az elmúlt években bármilyen módon segítséget nyújtott a kutatásaimmal kapcsolatban. Köszönöm Dr. Sümei Balázs Professzor Úrnak, hogy az intézetünk és a doktori iskola vezetőjeként lehetővé tette számomra, hogy a témában kutassak. Hálás vagyok a Septic Shock Team minden egykori és jelenlegi tagjának – Radnai Balázsnak, Tucsek Zsuzsannának, Kálmán Nikolettának, Fónai Fruzsinnak, Jakus Péternek, Dombóvári Péternek és mindenekelőtt témavezetőmnek, Veres Balázsnak – hogy a munkát egy szellemileg termékeny, és mindenkor baráti légkörben végezhettem. Köszönöm a technikai segítséget Pásztor Annának, Horváth Bertalannak, Girán Lászlónak és Halász Helénának. Az analógok szintéziséért Dr. Kálai Tamást és Dr. Mátyus Pétert illeti köszönet. Köszönöm továbbá a családomnak és Máténak, hogy mindvégig támogattak.

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program (Apáczai Csere János Doktoranduszi Ösztöndíj) kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. A kutatáshoz a PTE ÁOK-KA-2013/31 támogatás is hozzájárult a vegyszerek és eszközök biztosításával.