

Glukuronidtranszport az endoplazmás retikulumban

Doktori értekezés

Dr. Révész Katalin

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Csala Miklós egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Monostory Katalin tudományos főmunkatárs, Ph.D.
Dr. Ambrus Attila egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság

elnöke: Dr. Tretter László egyetemi tanár, Ph.D.

tagjai: Dr. Jemnitz Katalin tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Dr. Komorovicz Erzsébet egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest
2014

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2
2. Ábrák jegyzéke	5
3. Táblázatok jegyzéke	5
4. Rövidítések jegyzéke	6
5. Irodalmi áttekintés	9
5.1. Az endoplazmás retikulum mint önálló metabolikus kompartment	9
5.2. Glukuronidáció – deglukuronidáció az endoplazmás retikulumban.....	11
5.2.1. Glukuronsavas konjugáció, az UDP-glukuronozil-transzferázok.....	11
5.2.2. Az UGT latenciája, az UDP-glukuronsav transzportja	14
5.2.3. A mikroszomális β -glukuronidáz	15
5.2.4. Glukuronidtranszport az endoplazmás retikulum membránján keresztül	19
5.3. A morfin biotranszformációja.....	22
5.4. A zöld tea flavanolak és az endoplazmás retikulum.....	24
6. Célkitűzések	28
7. Módszerek	29
7.1. Patkány máj mikroszóma készítése	29
7.2. Sejtenyészet fenntartása, kezelése	30
7.3. A glukuronidáz aktivitás mérése.....	30
7.4. A morfin-glukuronidáció vizsgálata.....	31
7.5. Glukuronidtranszport-mérés	32

7.5.1. Az M3G transzportjának mérése	33
7.5.2. Az EGCG glukuronidtranszportra gyakorolt hatásának vizsgálata	34
7.6. A MUMB és a MUGA mennyiségének mérése nagy teljesítményű folyadék- kromatográfia (high performance liquid chromatography, HPLC) segítségével.....	34
7.7. Az M3G mennyiségének mérése folyadékkromatográfia – tömegspektrometria (liquid chromatography – mass spectrometry, LC-MS) segítségével.....	35
7.8. Statisztikai analízis	35
8. Eredmények	37
8.1. Az <i>in situ</i> keletkező morfin-3-glukuronid lumenális akkumulációjának vizsgálata	37
8.1.1. Az M3G-felvétel és leadás időfüggésének vizsgálata patkány máj mikroszómán	37
8.1.2. Az M3G felvételének koncentrációfüggése	42
8.1.3. Morfinglukuronidáció intakt és permeabilizált mikroszómában	43
8.1.4. Az újonnan keletkezett M3G akkumulációja intakt mikroszómában	44
8.2. A zöld tea flavanolk glukuronidtranszportra kifejtett hatásának vizsgálata	46
8.2.1. A β -glukuronidáz aktivitásának és latenciájának mérése.....	46
8.2.2. A zöld tea flavanolk hatása a β -glukuronidáz aktivitására mikroszómában és hepatoma sejtekben	48
8.2.3. Az EGCG hatása a mikroszomális glukuronidtranszportra	53
9. Megbeszélés	55
10. Következtetések.....	65
11. Összefoglalás	67
12. Summary.....	68

13. Irodalomjegyzék	69
14. Saját publikációk jegyzéke	83
14.1. A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények.....	83
14.2. A disszertáció témájához nem kapcsolódó közlemények.....	83
15. Köszönetnyilvánítás	84

2. Ábrák jegyzéke

1. ábra: Az UDP-glukuronozil-transzferáz és a β -glukuronidáz működése	13
2. ábra: Glukuronidok prereceptorális aktiválása	17
3. ábra: Az eltérő specificitású glukuronid-transzporterek modellje.....	20
4. ábra: A fontosabb katekinek szerkezete	26
5. ábra: Az M3G felvételének időfüggése patkány máj mikroszómában.....	38
6. ábra: A mikroszómához asszociált és a minta teljes M3G-tartalma közötti összefüggés egyensúlyi állapotban	39
7. ábra: Az M3G leadásának időfüggése patkány máj mikroszómában.....	41
8. ábra: A mikroszomális M3G-transzport koncentrációfüggése	42
9. ábra: A vezikulumok M3G-tartalmának alakulása <i>in situ</i> glukuronidáció esetén.....	44
10. ábra: A lumenálisan keletkező M3G akkumulációja intakt mikroszómában.....	45
11. ábra: Patkány máj mikroszóma glukuronidáz (MUGA-hidroláz) aktivitása.....	48
12. ábra: Az EGCG glukuronidázra gyakorolt gátló hatásának koncentrációfüggése	50
13. ábra: EGCG hatása egér hepatoma sejtek glukuronidáz aktivitására	51
14. ábra: A MUGA felvételének időfüggése patkány máj mikroszómában.....	52
15. ábra: Az EGCG glukuronidtranszportra gyakorolt hatásának koncentrációfüggése.....	54

3. Táblázatok jegyzéke

1. táblázat: A morflinglukuronidáció sebessége intakt és permeabilizált mikroszómában.	43
2. táblázat: A zöld tea flavanolk hatására a mikroszomális β -glukuronidázra	47
3. táblázat: A glukuronidáz kinetikai paramétereinek változása EGCG hatására	49

4. Rövidítések jegyzéke

α -MEM: α Minimum Essential Medium

ABC: ATP binding cassette

ATP: adenzin-trifoszfát

DIDS: 4,4'-diizotiocianostilbene-2,2'-diszulfonsav

DNS: dezoxiribonukleinsav

EC: epikatekin

EC₅₀: 50 %-os effektív koncentráció

ECG: epikatekin-gallát

EGC: epigallokatekin

EGCG: epigallokatekin-gallát

ER: endoplazmás retikulum

EST: expressed sequence tag

FBS: fetal bovine serum

GC: gallokatekin

GCG: gallokatekin-gallát

GTP: guanozin-trifoszfát

HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav

HPLC: high performance liquid chromatography, nagy teljesítményű

folyadékkromatográfia

IC₅₀: 50%-os gátló koncentráció

K_i: inhibitoros állandó

K_m: Michaelis-Menten állandó

LC-MS: liquid chromatography – mass spectrometry, folyadékkromatográfia –
tömegspektrometria

M3G: morfin-3-glukuronid

M6G: morfin-6-glukuronid

MOPS: 4-morfolin-propánszulfonsav

MUGA: metil-umbelliferil-glukuronid

MUMB: metil-umbelliferon

NAD⁺: oxidált állapotú nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADH: redukált állapotú nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADP⁺: oxidált állapotú nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NADPH: redukált állapotú nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

naftol AS-BI: a 7-bromo-3-hidroxi-2-nafto-o-anizidin rövidebb neve

NST: nucleotide sugar transporter

OATP: organic anion transporter protein

PBS: phosphate buffered saline

PSA: prosztata-specifikus antigén

SD: standard deviation, szórás

UDP: uridil-difoszfát

UGT: UDP-glukuronozil-transzferáz

v_{\max} : maximális reakciósebesség

5. Irodalmi áttekintés

5.1. Az endoplazmás retikulum mint önálló metabolikus kompartment

Az endoplazmás retikulum (ER) a sejtmagmembránnal egybekapcsolódó membránrendszer, mely a sejten belül egy, a citoszoltól elkülönülő belső teret, lument fog közre. Az organellum membránja fehérjékben igen gazdag, jellemzője a viszonylag nagy permeabilitás. A korábbi állásfoglalással szemben – miszerint az ER membránja a molekulák számára szabadon átjárható, a membrán pusztán a fehérjék kihorgonyzására szolgál – azonban több megfigyelés szolgáltat bizonyítékot arra, hogy a membrán számos vegyület számára barriert képez [1]. Az organellum lumene az anyagcsere fontos lépéseinek ad otthont. Itt zajlik a szekrécióra kerülő fehérjék szintézise és érése, a szénhidrát- és a szteroidmetabolizmus egyes reakciói. Ezekon kívül a biotranszformáció több enzime is itt működik, így az „előkészítő” fázishoz sorolható, 1-es típusú 11 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz, valamint a konjugációs fázishoz tartozó szteroid-szulfatáz, UDP-glukuronozil-transzferáz izoenzimek (UGT-k) és β -glukuronidáz. Ezekhez a folyamatokhoz az ER ideális mikrokörnyezetet teremt. Az ER tiol-oxidáló környezete, amelyet jól mutat a citoplazmához képest lényegesen (akár 30-100-szor) alacsonyabb redukált-oxidált glutation arány, szükséges a diszulfid-hidak kialakulásához, vagyis az oxidatív fehérjehajtogatáshoz [2]. Ezzel párhuzamosan a luminális redukált-oxidált piridin-nukleotidok (NADPH-NADP⁺) magas aránya teszi lehetővé a kortizon-kortizol átalakulást [3]. Az ER lumene a sejt legjelentősebb, gyorsan mobilizálható kalciumraktáraként a citoplazmára jellemzőnél négy nagyságrenddel magasabb kalciumkoncentrációt tart fenn [4], ami az UGT-k és a chaperonok működéséhez elengedhetetlen [5]. Ez a különleges, a citoplazmától jelentősen eltérő milió nem lenne fenntartható, ha az ER membránja nem korlátozná az anyagok vándorlását a két kompartment között.

A nagyméretű, poláros és gyakran töltéssel rendelkező molekulák a lipid kettősrétegen egyszerű diffúzió segítségével nem jutnak át, felvételük csak fehérje közreműködésével lehetséges. A transzport legtöbbször szelektív: míg bizonyos molekulák (pl. glukóz-6-foszfát vagy FAD) számára biztosított az átjutás, addig igen hasonló méretű

és szerkezetű vegyületek (például más hexóz-foszfátok és piridin-nukleotidok) számára nem. A membrán transzport folyamatai biztosítják a luminális enzimek szubsztrát- és kofaktorellátását. A transzport szelektivitása meghatározhatja az enzim szubsztrátspecifitását, ezt látjuk a glukóz-6-foszfátáz esetében. Még gyakoribb, hogy a reakció kinetikai paraméterei változnak meg, mert a lassú transzport korlátozza az enzim hozzáférését szubsztrátjához. Ezt mutatja, hogy sok enzim esetében ép membrán mellett alacsonyabb aktivitás mérhető, mint a membrán átjárhatóvá tétele, permeabilizálása után. Utóbbi esetben ugyanis az enzim szabadon hozzáfér szubsztrátjához, aktivitását a szubsztrát membránon keresztüli transzportja nem limitálja. A latenciának nevezett jelenség egyrészt az enzim luminális elhelyezkedését bizonyítja, másrészt azt mutatja, hogy a transzport az adott folyamat sebességmeghatározó lépése. Ha az aktivitásokban észlelt különbséget a permeabilizált membrán mellett mért érték százalékában fejezzük ki, a latencia értékét számszerűleg is megkapjuk. (Ha például egy luminális enzim aktivitása a membránpermeabilizálás következtében négyszeresére fokozódik, akkor 75%-os latenciáról beszélhetünk.)

Az ER mérete sejttípusonként igen eltérő. Néhány sejtben szinte kizárólag a sejtmagburokra korlátozódik, míg másutt a citoplazma jelentős részét kitölti. Ez utóbbira jó példa a májsejt, amely, az intermedier metabolizmusban, és különösen a biotranszformációban betöltött központi szerepének megfelelően, igen fejlett ER hálózattal bír. Az organelum a májsejt térfogatának 10%-át foglalja el, a sejt membránjainak pedig több mint 90%-át alkotja [1, 6].

A megfelelő sejtekből, illetve szövetekből preparált mikroszómát kiterjedten használják a – más sejtalkotóktól elkülönített – ER működésének *in vitro* vizsgálatához. Ennek előállításakor a homogenizált biológiai mintában frakcionált centrifugálás segítségével választjuk szét az egyes sejtalkotókat. A procedúra során az ER membránja feltöredezik és az egybefüggő, hálózatos membránrendszerből apró vezikulumok jönnek létre. A membrán integritása ugyanakkor nem sérül, és nem változik meg orientációja sem: a korábbi intraluminális felszín továbbra is a vezikulumok belseje felé néz [7]. Fontos kiemelni, hogy a mikroszóma intravezikuláris közege sok vonatkozásban az ER-lumen mikro környezetéhez hasonló: megmaradnak azok a jellegzetességek, amelyek fenntartásához állandó aktív transzport nem szükséges (pl. magas diszulfid/tiol és NADPH/NADP⁺ arányok). Az így létrejött vezikulumok a frakcionált centrifugálás utolsó

lépésében kiüledve alkotják tehát a mikroszóma nevű mesterséges sejtfrakciót. A mikroszóma olyan sejtek esetében, melyek bőséges ER-membránt tartalmaznak és a sejtmagmembrán mennyisége ehhez képest elhanyagolható, szinte teljes egészében ER-eredetű vezikulumokból áll. A preparátum tisztaságát az egyes sejtalkotókra jellemző enzimek aktivitásának vizsgálatával ellenőrizzük. Így a plazmamembrán jelenlétét az 5'-nukleotidáz vizsgálatával, a mitokondriális szennyeződést a citokróm-c oxidáz aktivitásának mérésével tudjuk kizárni. Az ER marker enzimének, a glukóz-6-foszfátáznak magas aktivitása igazolja, hogy a mikroszóma frakció ER-eredetű vezikulumokat tartalmaz. A membrán épségét a mannóz-6-foszfátáz magas latenciájának mérésével ellenőrizzük. Ez a hexóz-foszfát ugyanis intakt membrán esetén rendkívül lassan lép a lumenbe, és így enzimatis hidrolízise is alig detektálható. Amennyiben a membránt permeabilizáljuk, a lumenális glukóz-6-foszfát a mannóz-6-foszfátot is elfogadja szubsztrátként, és így magas enzimaktivitást mérünk [8].

5.2. Glukuronidáció – deglukuronidáció az endoplazmás retikulumban

5.2.1. Glukuronsavas konjugáció, az UDP-glukuronozil-transzferázok

A biotranszformáció második, konjugációs fázisának mennyiségi szempontból legjelentősebb reakciója az ER lumenében zajló glukuronsavas konjugáció. A lumenális aktív centrummal rendelkező UDP-glukuronozil-transzferáz (UGT) enzimek az UDP-glukuronsav glukuronozilcsoportját az aglikon nukleofil funkciós csoportjára (például hidroxil-, karboxil-, amino- vagy tiolcsoportjára) helyezik (1. ábra). A reakció terméke a töltéssel rendelkező, vízdékony β -D-glukuronid, melyet a szervezet ily módon előkészített az epe vagy a vizelet útján való kiválasztásra. Az esetek többségében a konjugáció a korábban aktív vagy toxikus vegyületek inaktiválását is eredményezi. Létezik azonban kivétel is: a morfin-6-glukuronid a μ -opioid receptor hatékony agonistája, és még az eredeti vegyületnél is erősebb analgetikus hatással bír. A morfin biotranszformációja során keletkező másik konjugátum, a morfin-3-glukuronid azonban nem kötődik a μ -opioid receptorhoz, így fájdalomcsillapító hatása nincs [9, 10].

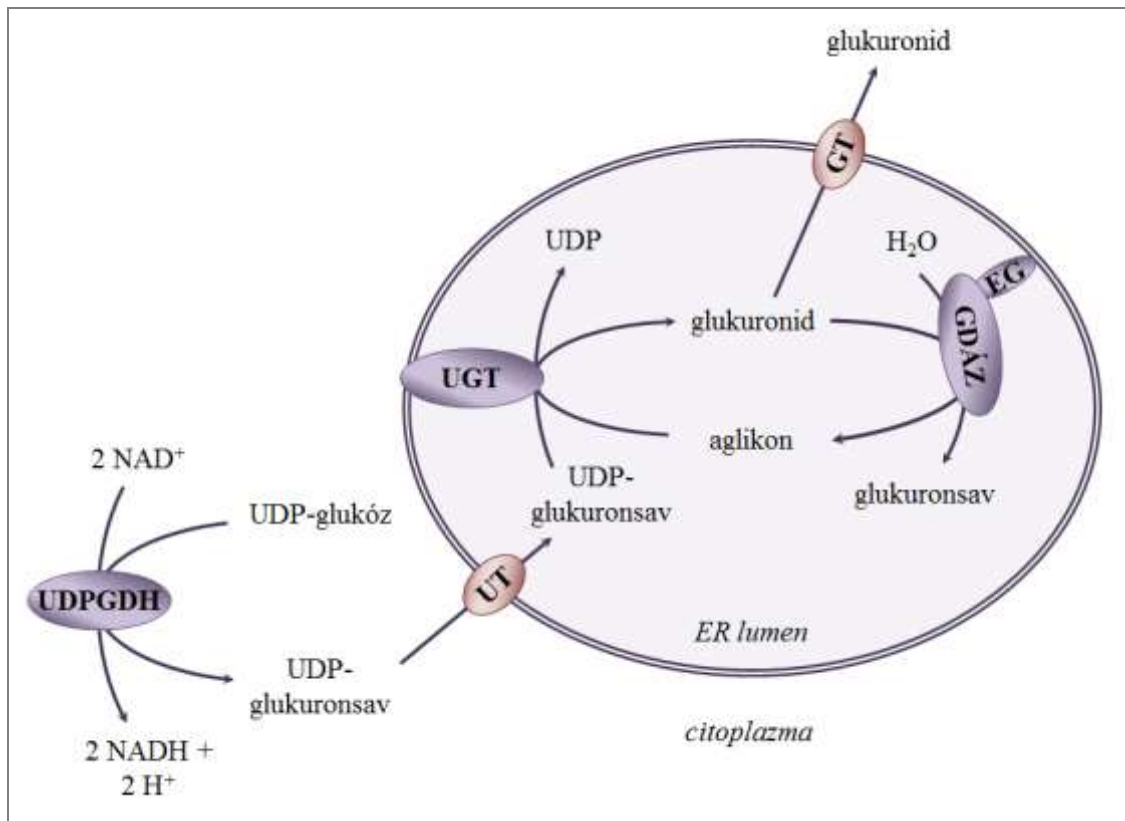
A biotranszformáció során a xenobiotikumok széles skáláját képes szervezetünk átalakítani és kiválasztásra alkalmassá tenni. A kémiai karcinogének jelentős részét

glukuronsavas konjugáció segítségével elimináljuk [11], így az UGT-k működése a napjaink egyik legnagyobb egészségügyi problémáját jelentő daganatos megbetegedések megelőzésében is fontos szerepet játszik. Ugyanakkor sok gyógyszermolekula, köztük kemoterápiás szerek vagy a posztoperatív és a daganatos fájdalomcsillapításban széles körben alkalmazott morfin is az UGT-k szubsztrátja. Ezen gyógyszerek farmakokinetikája jelentős mértékben függ a glukuronidáció sebességétől [12]. A sokat vizsgált irinotecan (a colorectalis malignomák kezelésében használt kemoterápiás szer) esetében például kimutatták, hogy a gyógyszert konjugáló UGT izoenzim egyik polimorfizmusa (UGT1A1*28), mely az enzim csökkent működését eredményezi, fokozott rizikót jelent súlyos mellékhatások jelentkezésére [13, 14].

Számos endogén – ám szervezetünkben le nem bontható – molekula is glukuronsavas konjugáción esik át, ilyen például a hem molekulából első fázisos biotranszformációs enzimek által létrehozott bilirubin. Az ilyen, úgynevezett endobiotikumok eliminálását endogén méregtelenítésként is felfoghatjuk. Ezen felül a biotranszformáció enzimeit a szervezetben kémiai jelként viselkedő szignálmolekulák metabolizmusának lépéseit is katalizálják. A retinoidok, a pajzsmirigy-hormonok, a szteroid hormonok és a katekolaminok például szintén glukuronidáció segítségével inaktíválódnak.

A biotranszformáció fő színtere a máj, itt zajlik az endo- és xenobiotikumok többségének átalakítása az előkészítő és a konjugációs fázis során. Az UGT-k is legnagyobb mennyiségben a májban található meg, jelenlétüket azonban számos egyéb szövetben is kimutatták, így a vesében, a tüdőben, a gyomor-bél rendszerben, a bőrben, a szaglóhámában, a herében, a petefészekben és a prosztatában [15]. Azon kívül, hogy a glukuronsavas konjugáció részt vesz a méregtelenítés szisztémás feladatában, az UGT-k helyileg, az egyes sejtek működésének modulálásában is szerepet játszanak. Egy androgénfüggő prosztatatarák sejtvonalban az intracelluláris tesztoszteronszint és a tesztoszteron hatására termelődő PSA (prosztata-specifikus antigén) mennyisége a sejtek UGT aktivitásával mutatott összefüggést [16]. A szaglóhám UGT-je az illatanyagok inaktíválása révén a szaglás és az ízlelés folyamatában töltenek be központi szerepet. Számos esetben kimutatták, hogy egy szövet alacsony UGT aktivitása a rákkeltő vegyületek csökkent lokális inaktíválását, és így az érintett sejtek rosszindulatú elváltozásának gyakoriságát vonja maga után. Példaként említhetjük a szájnyálkahártyában

expresszálódó, a dohányfüst karcinogénjeit metabolizáló UGT1A7 izoenzimet, melynek csökkent működése fokozza a dohányosokban kialakuló orolaryngealis carcinoma kockázatát [17]. Az endometriumrák rizikóját ezzel szemben csökkenti a méhnyálkahártyában található UGT1A1 izoenzim alacsony aktivitása, amit az antiproliferatív hatású 2-hidroxi-ösztadiol kisebb mértékű glukuronidációjával magyaráztak [18].



1. ábra: Az UDP-glukuronozil-transzferáz és a β -glukuronidáz működése

A citoplazmában keletkező, facilitált diffúzióval az ER lumenébe belépő UDP-glukuronsavról az UGT izoenzimek glukuronozilcsoportot helyeznek rá endogén és exogén szubsztrátjaikra. A keletkező vízdékony glukuronid vagy fehérjemediált transzport segítségével elhagyja az ER lumenét, vagy a β -glukuronidáz szubsztrátjaként szolgál. Utóbbi esetben enzimatiszus hidrolízis során felszabadul az eredeti aglikon. A glukuronidáció és deglukuronidáció sebessége együttesen határozza meg az endo- és xenobiotikumok eliminációjának ütemét. (EG: egazin, GT: glukuronid-transzporter, GDÁZ: mikroszomális β -glukuronidáz, UDPGDH: UDP-glukóz-dehidrogenáz, UT: UDP-glukuronsav-transzporter)

5.2.2. Az UGT latenciája, az UDP-glukuronsav transzportja

A biotranszformáció több enzime, így az UGT-k is szabályozhatók transzkripció szinten, indukció segítségével [19]. Ezzel a mechanizmussal az UGT-k aktivitása 3-5-szörösére növelhető. Az indukció szerepe azonban megkérdőjelezhető, hiszen *in vivo* az UGT-k kapacitásuknak csak kis hányadát használják ki, működésüket ugyanis a kofaktorellátás jelentősen korlátozza. A konjugációhoz szükséges UDP-glukuronsav a citoplazmában keletkezik, amikor az itt található UDP-glukóz-dehidrogenáz az UDP-glukózt két lépésben oxidálja (1. ábra). Az UGT-k ugyanakkor az ER integráns membránfehérjéi, melyeknek aktív centruma a lumenben helyezkedik el [20, 21]. Az enzim lumenális elhelyezkedésének következménye, hogy működéséhez szükség van a szubsztrát, a kofaktor és a termékek transzportjára az ER membránján keresztül. Az UGT lipofil szubsztrátja számára az ER membránja rendszerint nem képez barriert, az aglikon feltehetőleg egyszerű diffúzió segítségével, fehérje közreműködése nélkül jut be a lumenbe. A töltéssel rendelkező, nagyméretű UDP-glukuronsav és a glukuronidok ugyanakkor nem tudnak átdiffundálni a lipid kettősrétegen [22]. Jelenlegi ismereteink szerint transzportjuk fehérjemediált, facilitált diffúzió segítségével megy végbe [23-25].

Az UDP-glukuronsav transzportjáról tudjuk, hogy az általános aniontranszportgátló szerek, a tiol-alkiláló N-etil-maleimidin, valamint némely hisztidil-specifikus irreverzibilis gátlószer fékezik, míg Mg^{2+} , GTP, valamint bizonyos uridin-nukleotidok serkentik a folyamatot; a transzport ugyanakkor ATP-től független [23, 24, 26-29].

Az UDP-glukuronsav és bizonyos glukuronidok között működő antiport mechanizmust is feltártak: eszerint a citoplazmatikus UDP-glukuronsav az ER lumenében újonnan keletkezett fenil-glukuronidokra cserélődhet [30]. Más vizsgálatok azt mutatták, hogy az UDP-glukuronsav részben a kis kapacitású transzlokon peptidcsatornákon keresztül, facilitált diffúzió segítségével is beléphet a lumenbe [31].

Felvetődött annak a lehetősége is, hogy az UDP-glukuronsav az NST (nucleotide sugar transporter) fehérjecsalád egyes tagjainak közreműködésével jut át az ER membránján. Ez a transzporter család a felelős a fehérjék ko- és poszttranszlációs glikozilációjához szükséges UDP-cukrok felvételéért az ER-be és a Golgiba. Az EST (expressed sequence tag) adatbázis és rekombináns DNS technikák segítségével már több olyan NST-t is leírtak, ami UDP-glukuronsav szállítására is képes, valamint heterológ

expresszió esetén az ER-ben található [32, 33]. E fehérjék fiziológias szerepe, valamint részvétele a glukuronidáció folyamatában azonban egyelőre kérdéses [6].

Bár a transzportban résztvevő fehérjéket nem ismerjük pontosan, funkcionális vizsgálatok alapján tudjuk, hogy az UDP-glukuronsav luminális felvétele a glukuronidáció sebességmeghatározó lépése. Ezt mutatja az UGT-aktivitás jelentős latenciája: a membrán „kilyuggatása”, permeabilizálása a glukuronidáció sebességét 10-20-szorosára növeli [34]. Ilyenkor az enzim korlátlanul hozzáfér az UDP-glukuronsavhoz, míg intakt membrán mellett az UGT működése a transzport folyamatok függvénye. Az UGT-kre jellemző mintegy 90%-os latenciáért tehát jelenleg az UDP-glukuronsav fehérjemediált transzportját tesszük felelőssé [35]. Figyelemre méltó ugyanakkor, hogy intakt mikroszómában a glukuronidáció sebessége különböző UGT-szubsztrátok esetében eltérő, annak ellenére, hogy minden esetben UDP-glukuronsav szolgáltatja a konjugációhoz szükséges glukuronozilcsoportot. Így a kofaktor lassú transzportja nem magyarázza meg teljes mértékben az észlelt latenciát. Elképzelhető, hogy a termék luminális felhalmozódása is fékezi a glukuronidáció sebességét, amennyiben a glukuronid kifelé irányuló transzportja nem tud lépést tartani a konjugáció sebességével.

5.2.3. A mikroszomális β -glukuronidáz

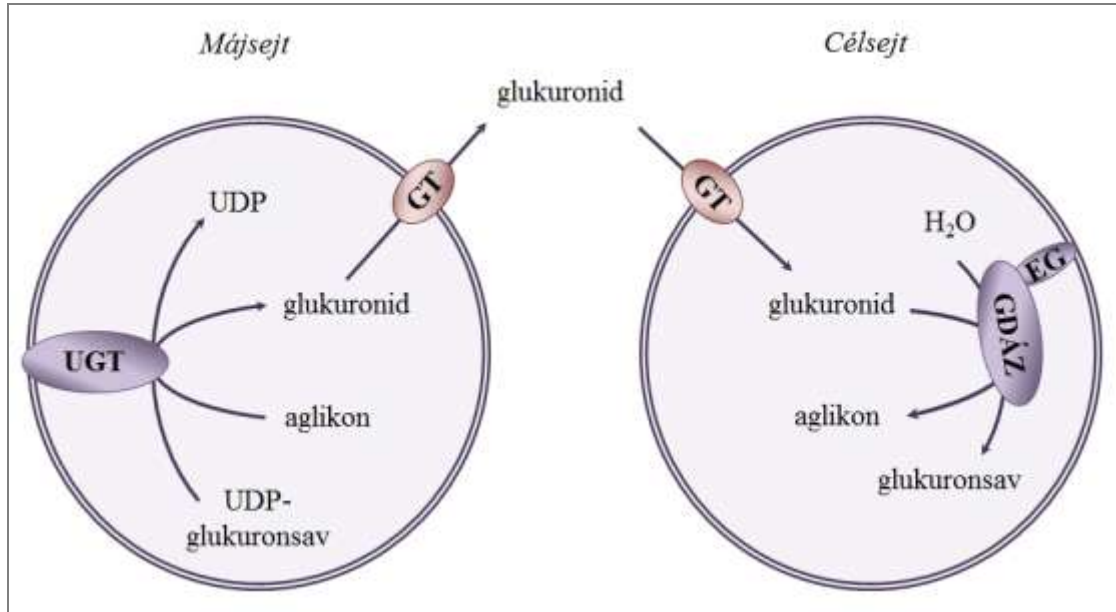
A glukuronidáció sebességét nem csak a transzport folyamatok fékezik. A létrehozott glukuronidok egy része enzimatisz hidrolízisen esik keresztül, aminek következtében felszabadul az eredeti, konjugátlan aglikon (1. ábra). A glukuronidáció jellemzően inaktiváló funkciója értelmében tehát ilyenkor az általában biológiai hatással bíró gyógyszer vagy mérgező vegyület keletkezik újra. A reakciót az UGT-kkel azonos kompartmentben, szintén az ER lumenében elhelyezkedő β -glukuronidáz katalizálja. A szolubilis enzim az ER retenciós szignállal rendelkező egazin nevű fehérjéhez kapcsolódik, ez biztosítja az enzim luminális lokalizációját [36]. A β -glukuronidáz első megközelítésben az UGT-k ellenében dolgozik; az endo- és xenobiotikumok inaktiválásának és kiválasztásának nettó sebessége a két enzim működésének eredője. A glukuronidáció és a deglukuronidáció üteme a kémiai karcinogenezisben és a gyógyszermetabolizmusban meghatározó szerepet játszik.

A biotranszformáció fő helyszínein, mint a máj, a bél vagy a tüdő sejtjeiben egyidejűleg lehetnek jelen az UGT-k és a β -glukuronidáz (1. ábra). Érdekes megfigyelés, hogy az utóbbi enzim nagyobb affinitással bontja a gyakran toxikus acil-glukuronidokat, mint a rendszerint ártalmatlan aril-glukuronidokat [37]. Az UGT-k nem teljesen specifikusan helyezik rá a glukuronsavat a szubsztrát egyik vagy másik funkciós csoportjára, így sok molekula esetében mind acil- (karboxilcsoport konjugációja esetén), mind aril-glukuronidok (fenolos hidroxilcsoport konjugációja esetén) létrejöhetnek. Az acil-glukuronidok instabilitásuk miatt a DNS- és a fehérjemolekulákat károsíthatják, így elhasításuk a szervezet védelmét szolgálja. Ezen alapszik az a hipotézis, hogy a mikroszomális β -glukuronidáz feladata az acil-glukuronidok arányának a csökkentése.

A β -glukuronidáz nem csak az intenzíven konjugáló sejtekben van jelen. A glukuronidok hidrolízise azok keletkezésétől térben elválasztva, más szövetekben is végbemehet. Okkal feltételezhető tehát, hogy a glukuronsavas konjugátumok formájában keringő, inaktív hormonok például magukban a célsejtekben reaktiválódhatnak (2. ábra). A hormonok úgynevezett prohormonokból történő lokális keletkezését már több esetben leírták: ismert például a tesztoszteron-dihidrotesztoszteron [38], kortizon-kortizol [39, 40] vagy tetrajódtironin (tiroxin)-trijódtironin [41] átalakulás. Sőt, akad példa a hormon-biotranszformáció végtermékeinek dekonjugációs újraaktiválására is: az ösztrogénszulfátok ugyanis ismét hatásos ösztrogén hormonokká alakulnak a szteroid-szulfatáz által katalizált reakcióban [42].

Ezt a jelenséget pre-receptorális hormonaktiválásnak nevezzük. Elképzelhető, hogy a mikroszomális glukuronidáz szintén hasonló szerepet játszik a glukuronidációval inaktiválódó hormonok hatásának szabályozásában. Ebben a megvilágításban a glukuronidok tulajdonképpen az aglikon vérben szállított, vízdoldékony formái, és az ilyen, inaktív formában keringő prohormonokat a célsejtek esetleg újraaktiválhatják. A hidrolízist követően ugyanis a felszabadult ligand receptorához kötődve kifejtheti hatását.

Ismert, hogy számos endo- és xenobiotikum enterohepatikus körforgásában a bélflóra kitüntetett szerepet játszik. A bakteriális hidrolázok ugyanis a bélbe kerülő konjugátumok bontásával lehetővé teszik az immár lipiddoldékony vegyületek ismételt felszívását. Ugyanakkor a bélhámsejtek β -glukuronidáza szintén hozzájárulhat a felszívódó glukuronidok dekonjugálásához.



2. ábra: Glukuronidok prereceptorális aktiválása

A biotranszformációs reakciók legfőbb színterén, a májsejtben a xeno- és endobiotikumok széles skálája inaktívulódik glukuronsavas konjugáció segítségével. A vízoldékony metabolit a szisztémás keringésbe kerül, és eljut a távoli célsejtekig. Itt a glukuronid ismét belép az ER lumenébe, és enzimatisz hidrolízisen esik keresztül. Az eredeti, biológiai aktív, esetleg toxikus aglikon így felszabadul és lokálisan kifejtheti hatását. (GT: glukuronid-transzporter, EG: egagrin, GDÁZ: mikroszomális β -glukuronidáz)

A β -glukuronidáz működése fékezi az endo- és xenobiotikumok gyors inaktíválását és eliminációját. A bilirubin epén át történő kiválasztását glukuronidázhiányos egerekben jelentősen magasabbnak találták, mint a kontroll állatokban [43]. A jelenség feltehetőleg kétkomponensű, hiszen az enzim hiányában már a májsejtben zajló bilirubin glukuronidáció is eleve gyorsabb lehet, ráadásul a konjugátum kiürülését még hatékonyabbá teheti az enterohepatikus körforgás csökkenése. Az antioxidáns bilirubin gyors eliminációja azonban nem feltétlenül előny. Ezt támasztja alá, hogy a bilirubin-UGT csökkent aktivitása következtében emelkedett szérumbilirubinszinttel járó Gilbert-kór véd az ischaemiás szívbetegséggel szemben [44]. Szelekciós előnyként talán ez magyarázza a Gilbert-kór viszonylag nagy gyakoriságát is.

Ugyanakkor a β -glukuronidáz működése következtében karcinogén vegyületek is reaktíválódnak, ami a sejtek malignus transzformációjának kockázatát fokozza.

Valószínűleg ezzel magyarázható, hogy egyes tumorok előfordulása és a glukuronidáz aktivitása között korrelációt figyeltek meg [45, 46].

A malignus sejtek glukuronidázának fokozott aktivitása a kemoterápiában is felhasználható. A szelektivitás érdekében „prodrug” formájában, glukuronidként adott gyógyszert a tumorsejt – fokozott glukuronidáz aktivitásának köszönhetően – hidrolizálja és így aktiválja. Ezzel elérhető, hogy a kemoterápiás szer lokálisan fejtse ki hatását és így a szervezet egyéb sejtjeit – azok jóval alacsonyabb enzimaktivitása miatt –lényegesen kevésbé károsítsa [47, 48]. Előnyös tulajdonságaik ellenére a klinikai alkalmazás lehetőségét korlátozza a glukuronsavas konjugátumok rövid féléletideje és gyors renális eliminációja. Az elmúlt időben intenzív kutatások tárgya a hosszabb féléletidejű származékok kifejlesztése. Nemrégiben írtak le egy olyan glukuronid prodrugot (egy doxorubicin-származékot), ami a keringésben albuminhoz kötődik, így elkerüli a renális kiválasztást [49]. A hosszabb féléletidejű glukuronid prodrugok a közeljövő ígéretes terápiás lehetőségének tűnnek.

Szintén a karcinogén reaktiválódással függhet össze az a megfigyelés, hogy a β -glukuronidáz gátlószere, a gyümölcsökben és zöldségekben nagy mennyiségben megtalálható D-glukarát számos daganat kialakulásának kockázatát csökkenti [50].

Amikor az ER lumenében elhelyezkedő β -glukuronidáz a sejt által a vérből felvett, azaz nem helyben keletkezett glukuronidot bont, működésének feltétele, egyben sebességmeghatározó tényezője a szubsztrát felvétele az ER-be. A töltéssel rendelkező, poláros glukuronidok fehérjemediált, passzív transzport segítségével jutnak be az organelum lumenébe [25]. Ép membrán mellett sok glukuronid beáramlása nem tud lépést tartani a hidrolízis sebességével. Ilyen szubsztrátok esetén az enzimaktivitás lényegesen alacsonyabb a membrán permeabilizálása után mérhetőnél, és így a β -glukuronidáz működése jelentős latenciát mutat [51]. Ennek alapján feltételezhető, hogy a glukuronidtranszport gátlása közvetve a deglukuronidáció folyamatát is fékezi, és ezzel számos karcinogén vegyület reaktivációját is korlátozza. A glukuronidtranszport specifikus gátlószereit – és így azok karcinogenitásra kifejtett esetleges hatásait – azonban eddig nem írták le.

5.2.4. Glukuronidtranszport az endoplazmás retikulum membránján keresztül

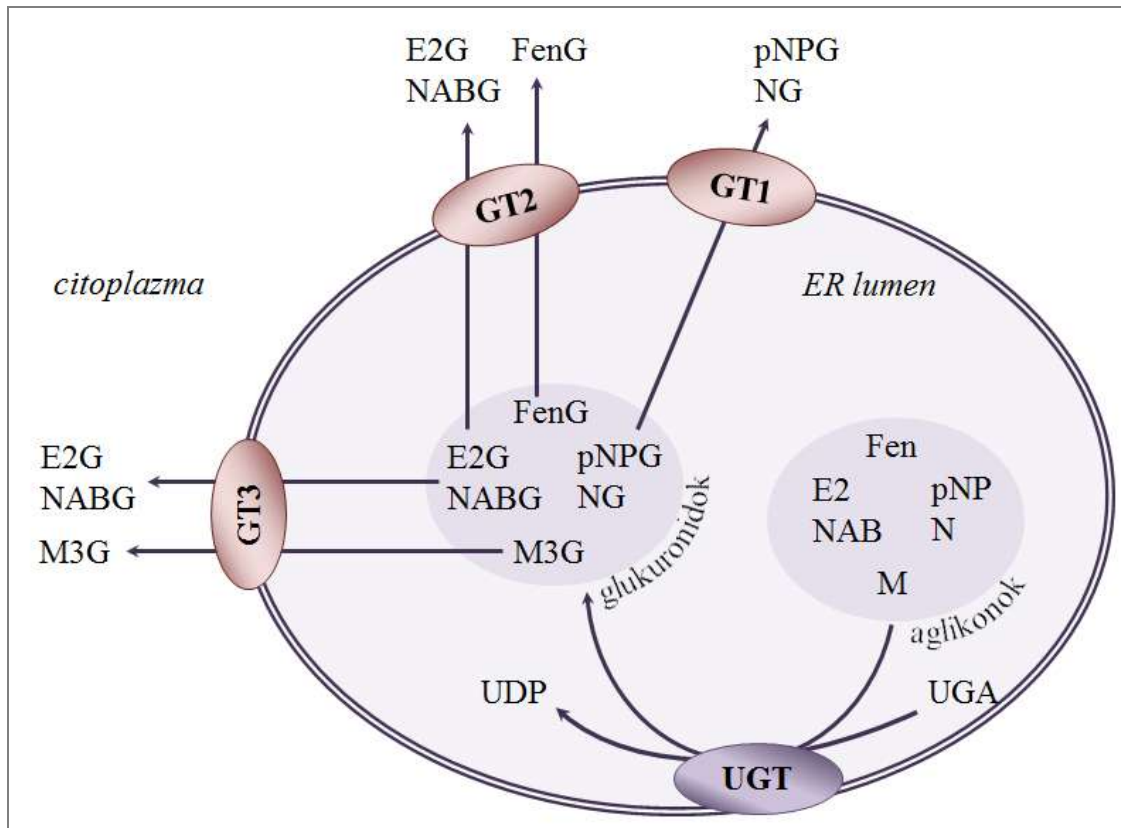
Az UGT-k által katalizált reakció végeztével a keletkező glukuronsavas konjugátumoknak el kell hagyniuk az ER lumenét. A mikroszomális β -glukuronidáz működéséhez – sok esetben – a glukuronidok ellenkező irányú transzportja szükséges.

Annak ellenére, hogy az ER glukuronidtranszportja több ponton befolyásolhatja az endo- és xenobiotikumok metabolizmusát, a transzportot végző fehérje (fehérjék) – az ER legtöbb transzporteréhez hasonlóan – még azonosításra vár (várnak), és működéséről (működésükről) is igen kevés ismerettel rendelkezünk. Mindez feltehetőleg annak tudható be, hogy az ER szűk lumene és a membrán magas fehérjetartalma rendkívül megnehezíti a transzportfolyamatok vizsgálatát és különösen a közreműködő fehérjék azonosítását.

Jelenleg a mikroszomális glukuronidtranszportról csupán funkcionális vizsgálatok eredményei állnak rendelkezésünkre. A glukuronozilcsoport a vegyületnek poláros karaktert, sőt negatív töltést is kölcsönöz, mely lehetetlenné teszi a lipid kettősrétegen keresztüli passzív diffúziót. A transzportról leírták, hogy fehérjemediált, kétirányú, telíthető, idő- és hőmérsékletfüggő folyamat. Az általános aniontranszport-gátló DIDS, probenicid és a tiol-alkiláló N-etil-maleimidin a glukuronidok mikroszomális felvételét lassította, a folyamat specifikus gátlószere azonban nem ismert [25, 52].

A plazmamembrán glukuronid-transzporterei az ABC (ATP binding cassette) és az OATP (organic anion transporter protein) transzporter családba tartoznak; működésük során ATP-t vagy redukált glutationt használnak. Ezzel szemben a mikroszomális glukuronidtranszport sebességét ATP és redukált glutation hozzáadásától függetlennek találták [25].

Az UDP-glukuronsav transz-aktiválja (vagyis a membrán átteljes oldaláról hatva serkenti) bizonyos fenil-glukuronidok (fenoltalein- β -D-glukuronid, p-nitrofenil- β -D-glukuronid) transzportját, míg más glukuronidok vizsgálatakor nem észleltek ilyen hatást [30, 53].



3. ábra: Az eltérő specificitású glukuronid-transzporterek modellje

A modell szerint az eltérő méretű glukuronidok különböző transzport fehérjék segítségével jutnak át az ER membránján. A legkisebbek transzportere (GT1) dolgozik a leggyorsabban. A terjedelmes morfin-3-glukuronid (M3G) ezzel szemben egy igen alacsony aktivitású transzporter (GT3) segítségével hagyja el a lument. A közepes méretű glukuronidok egy része nemcsak a saját, közepes sebességű transzporterén (GT2), hanem a lassú M3G transzporterén (GT3) keresztül is kiléphet az ER-ből.

(E2: ösztradiol, E2G: ösztradiol-glukuronid, Fen: fenolftalein, FenG: fenolftalein-glukuronid, M: morfin, M3G: morfin-3-glukuronid, N: naftol, NG: naftil-glukuronid, NAB: naftol AS-BI, NABG: naftol AS-BI glukuronid, pNP: para-nitrofenol, pNPG: para-nitrofenil-glukuronid, UGA: UDP-glukuronsav, GT1: kisméretű glukuronidok transzportere, GT2: közepes méretű glukuronidok transzportere, GT3: nagyméretű glukuronidok transzportere)

A jelek szerint egyes szulfokonjugátumok versenybe szállnak a glukuronid-transzporterért, míg mások, például az ösztron-3-szulfát, eltérő mechanizmussal lépik át az

ER membránját. A glukuronidok felvételét glukuronsav jelenléte nem befolyásolja [25, 53].

A hasonló méretű glukuronidok között kompetíciót figyeltek meg, míg az eltérő méretű konjugátumok nem mutatták ezt a jelenséget. Az ösztradiol-17 β -D-glukuronid felvételét például az ösztradiol-3 β -D-glukuronid és a fenolftalein- β -D-glukuronid gátolta. Ezzel szemben a kisméretű p-nitrofenil- β -D-glukuronid és p-acetamidofenil- β -D-glukuronid nem befolyásolta a transzport sebességét, annak ellenére, hogy ezek a vegyületek is felvételre kerülnek a mikroszómába [25].

Mivel a glukuronidok között fennálló kompetíciós mintázatból következtetni lehet arra, mely vegyületek vetélkednek azonos transzporter fehérje kötőhelyéért, a jelenséget tovább vizsgálták. A vizsgálat szerint a glukuronidok mérete és a transzport sebessége egymással fordított arányban állt. Leggyorsabban a kisméretű p-nitrofenil- β -D-glukuronid lépte át a membránt [52]. A közepes méretű ösztradiol-17 β -D-glukuronid, fenolftalein- β -D-glukuronid és naftol AS-BI β -D-glukuronid kompetitív módon gátolták egymás mikroszomális felvételét. Ezen vegyületek transzportját sem a kisméretű glukuronidok (p-nitrofenil- β -D-glukuronid, naftil- β -D-glukuronid), sem a nagyméretű, rigid struktúrájú morfin-3- β -D-glukuronid (M3G) nem befolyásolta. Az utóbbi vegyület igen lassan került felvételre a mikroszómába; a transzport kezdeti sebessége két nagyságrenddel kisebbnek bizonyult, mint a közepes méretű glukuronidok esetében [52]. Érdekes módon az M3G felvételét az ösztradiol-17 β -D-glukuronid és a naftol AS-BI β -D-glukuronid tovább lassította, bár fordított irányban kompetíció nem volt kimutatható. A megfigyelések arra utalnak, hogy az ER membránjában több (legalább három), eltérő specificitású glukuronid-transzporter fehérje található (3. ábra). A specificitás részben átfedő lehet, és a megfigyelések szerint a transzporterhez való kötődésben, illetve annak affinitása szempontjából a glukuronid mérete és alakja meghatározó szempont. Külön kiemelő az M3G igen lassú mikroszomális felvétele és más glukuronidokkal mutatott aszimmetrikus kompetíciója, amely összességében az alább leírt módon magyarázható. Az ER membránja – a modell szerint – tartalmaz egy kisebb, egy közepes méretű és egy nagyobb glukuronidokat szállító fehérjét, melyek aktivitása a ligand méretével fordított arányban áll. A kisebb glukuronidok nem interferálnak a másik két csoport tagjaival. A közepes méretű glukuronidok (ilyen az ösztradiol-17 β -D-glukuronid és a naftol AS-BI β -D-glukuronid) azonban saját transzporterük mellett a nagyobb konjugátumokat (pl. M3G-t) is

szállító, de nagyságrendekkel kisebb aktivitású transzporterén keresztül is beléphetnek a mikroszómába. Ez utóbbi transzporter a nagyobb glukuronidok számára az egyetlen átjutási lehetőséget kínálja, hozzájárulása a közepes glukuronidok mozgásához viszont elhanyagolható mértékű. Az M3G amúgy is lassú beáramlását tehát hatékonyan akadályozza az ösztradiol-17 β -D-glukuronid és a naftol AS-BI β -D-glukuronid azzal, hogy az M3G transzporteréért versenybe szállnak. E két közepes méretű glukuronid viszont akkor is változatlan sebességgel halad át a membránon, ha a nagyobbak transzporteréről az M3G kiszorítja őket [52].

Az eltérő specificitású glukuronid-transzporterek létezése mellett szólnak azon vizsgálat eredményei is, melyben egy konjugált hiperbilirubinémiában szenvedő beteg májából készült mikroszóma glukuronidtranszportját tanulmányozták. A bilirubin- β -D-diglukuronid ugyanis a mikroszóma membránon nem tudott keresztüljutni, míg a kisméretű naftil- β -D-glukuronid akadálytalanul kilépett a lumenből [54].

5.3. A morfin biotranszformációja

Az emberiség évezredek óta használja a mákgubó nedvét, az ópiumot fájdalomcsillapítás céljára. Feltételezések szerint már a sumérok is ismerték, első egyértelmű írásos említése pedig Theophrasztosztól származik a Kr.e. III. évszázadból. Legfontosabb alkaloidját, a morfint, Friedrich Wilhelm Adam Sertürner német gyógyszerész izolálta 1804-ben. A vegyületet az álmok görög istenéről, Morpheuszról nevezte el [55].

A megfelelő fájdalomcsillapítás napjainkban is az orvostudomány egyik legjelentősebb feladata. Felmérések szerint öt felnőtt közül egy krónikusan fennálló fájdalommal él együtt [56, 57]. Az előrehaladott daganatos betegségben szenvedők 90%-ának vannak fájdalmai. Ebben a betegcsoportban a fájdalomcsillapítás legfontosabb eszközei az opioid analgetikumok. Emellett az opiátok használata nem nélkülözhető a perioperatív időszakban és a nem daganatos eredetű krónikus fájdalmak csillapításában sem [58, 59].

A félszintetikus és szintetikus opiátok megjelenése ellenére továbbra is az egyik legfontosabb, legtöbbet használt major analgetikum a morfin. A kezelés során azonban számítanunk kell mellékhatások fellépésére is, melyeknek egy részéért nem magát a

morfint, hanem annak metabolitját teszik felelőssé. A terápia fejlesztéséhez, illetve vezetéséhez nagy segítséget nyújt a morfin biotranszformációjának minél alaposabb ismerete.

A morfinmetabolizmus elsődleges útja a májban zajló glukuronsavas konjugáció, melyet emberben az UGT2B7 izoenzim katalizál [60]. Az enzim a glukuronozilcsoportot a 3-as szénatom fenolos hidroxilcsoportjára és a 6-os szénatom alkoholos hidroxilcsoportjára egyaránt képes ráhelyezni; így a reakció során morfin-3- β -D-glukuronid (M3G) és morfin-6- β -D-glukuronid (M6G) keletkezik [61]. A két termék azonban nem egyforma mennyiségben termelődik: az előbbi konjugátumot az enzim mintegy ötszörös sebességgel állítja elő [62]. Mivel a konjugált morfinszármazékok is kifejthetnek központi idegrendszeri hatásokat, fontos tudni, hogy a máj mellett az emberi agy is képes morfin-glukuronidok előállítására [63].

Patkány májban a morfin glukuronidációját az UGT2B1 izoenzim végzi [64]. Előzetes heroinkezelés nélkül ebben a fajban csak M3G képződését figyelték meg [65, 66].

Miután a glukuronidáció az ER lumenében megy végbe, a keletkező glukuronidok az előző fejezetben részletesen tárgyalt fehérjemediált, passzív transzport segítségével lépnek ki a citoplazmába. Az M3G transzportja feltűnően lassú, sebessége több nagyságrenddel alacsonyabb, mint más glukuronidoké [52]. Könnyen elképzelhető, hogy az M3G kiáramlása nem tud lépést tartani a morfin-UGT működésével, vagyis a konjugátum lumenális keletkezésével. Ennek eredményeképpen a morfin biotranszformációja során keletkező M3G az ER lumenében felhalmozódhat. Ezt a gyanút erősíti az a megfigyelés is, hogy a morfin-UGT indukciója transz-stilbene-oxid [67, 68] vagy fenobarbitál segítségével [69, 70] a gyorsult ütemű morfinglukuronidáció ellenére nem fokozta az M3G biliáris kiválasztását. Egy másik kísérlet során az izolált, perfundált patkány májban a hepatociták kanalikuláris membránját elroncsolták, ennek ellenére a sejtek M3G-tartalmának nagy része változatlan maradt. Az M3G, ezek szerint, nem a citoplazmában, hanem attól elkülönülve található meg a sejtekben [71].

Miután a metabolitok az ER lumenét elhagyták, a sejthártya ABC-transzportereinek segítségével, aktív transzport folyamat során lépnek ki a citoplazmából [72]. A morfin-glukuronidok eliminációja nagyobb részben a vizeleten, kisebb részben az epén keresztül történik. Az epével ürülő konjugátumok jelentős hányada az enterohepatikus körforgás során ismét visszazívódik [73].

A morfin glukuronsavas konjugátumai más glukuronidoktól eltérően biológiailag aktív vegyületek, a morfin kezelés során tehát számolnunk kell a metabolitok által kifejtett hatásokkal is. Az M6G nagy affinitással kötődik a μ -opioid receptorhoz, így analgetikus hatása összemérhető a morfinéval. Különösen erős fájdalomcsillapító hatást figyeltek meg intracerebroventricularis adagolás után; szisztémás alkalmazás esetén azonban a vér-agy gáton csak igen kis mértékben jut át.

A lényegesen nagyobb mennyiségben előállított konjugátum, az M3G ezzel szemben nem agonistája a μ -opioid receptornak, fájdalomcsillapító hatást nem fejt ki. A nem opioid mediált, neurotoxikus mellékhatásokat (görcsök, hyperalgesia és allodynia) azonban ennek a vegyületnek tulajdonítják [10].

Emberben a morfinmetabolizmus egyéb útvonalai, mint az oxidáció, az N-demetiláció vagy a szulfátcsoporttal végzett konjugáció, sokkal kisebb jelentőségűek, mint a glukuronidáció. Még újszülöttek morfinkezelése során is csak minimális mennyiségű morfin-3-szulfát képződött, annak ellenére, hogy újszülöttkorban a glukuronsavas konjugáció éretlensége miatt a szulfatáció nagyobb szerepet kap a biotranszformáció folyamatában [74].

5.4. A zöld tea flavanolak és az endoplazmás retikulum

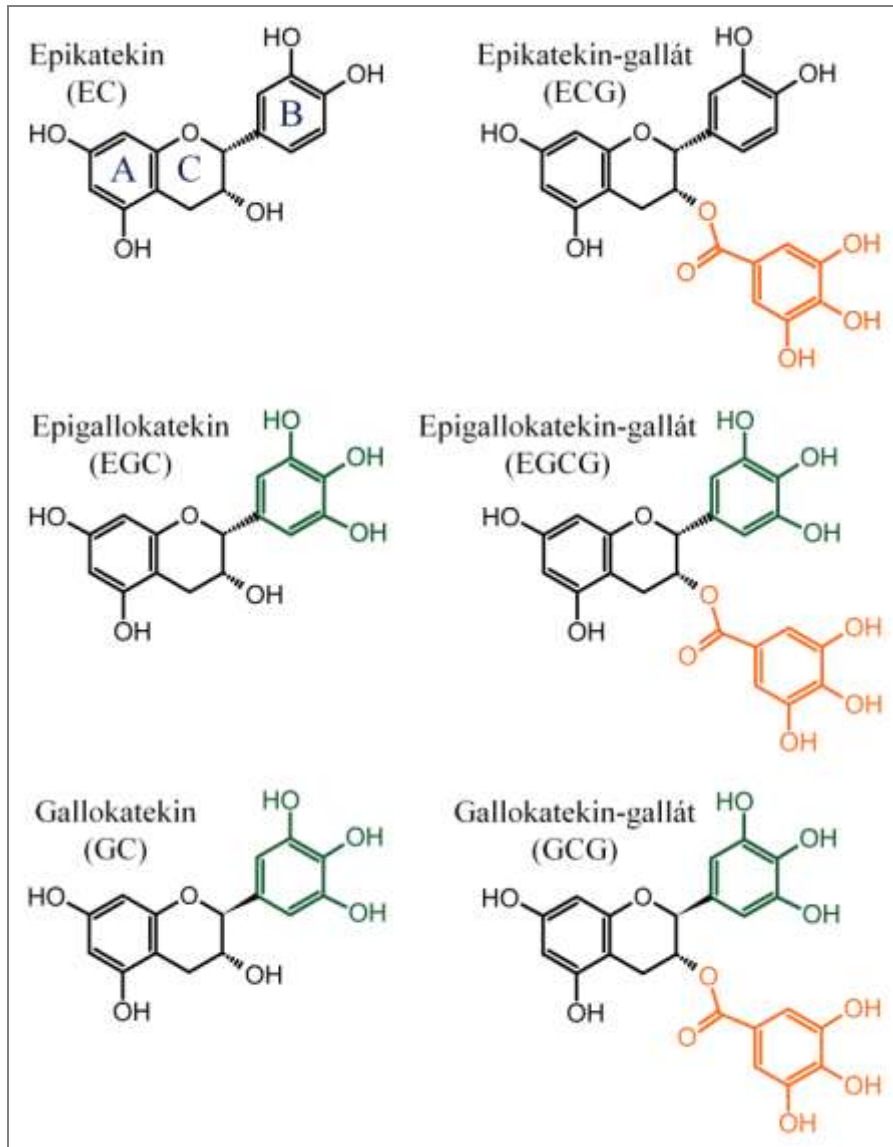
A teanővény (*Camellia sinensis*) leveleiből készített zöld tea a világon legnagyobb mennyiségben fogyasztott italok közé tartozik, népszerűsége – mára széles körben ismertté vált egészségmegőrző szerepének is köszönhetően – egyre nő. Már az ókori kínai medicina is gyógyhatású italként tartotta számon. Az elmúlt években a tudományos érdeklődés is fokozódott a zöld tea sokrétű jótékony hatásai iránt, így e hatásokat és azok mechanizmusait is egyre jobban megismerjük. Fogyasztása csökkenti a szív-érrendszeri betegségek és a metabolikus szindróma előfordulását, valamint neuroprotektív hatással bír. Emellett gátolja a rosszindulatú tumorok kialakulását és progresszióját a betegség minden stádiumában [75]. A zöld tea genoprotektív hatásának köszönhetően csökkenti az oxidatív DNS-károsodás mértékét [76], valamint akadályozza a sejtek malignus elfajulását és proliferációját, fokozza a transzformált sejtek apoptózisát [77]. Ezen túlmenően gátolja az angiogenezist [78] és a metasztázisok megjelenését [79].

Mindezen előnyös egészségügyi hatásokat a tealevélben található több száz vegyület közül a tea polifenoljainak, pontosabban katekinjeinek tulajdonítjuk. Ezek a vegyületek a zöld tea szárazanyag-tartalmának 30%-át teszik ki. A fekete és az oolong tea fermentálása során a polifenol-oxidáz enzim a katekin monomerekből oxidált és polimerizált vegyületeket (teaflavin, tearubigin) hoz létre, melyek a teának fekete színt és jellegzetes aromát kölcsönöznek. Ezzel szemben a zöld teát a levelek szárításával állítják elő, a folyamat során a polifenol-oxidáz inaktív, és így az elkészült teafű nagy mennyiségben tartalmazza a jótékony hatású katekineket [80, 81].

A tealevélben található polifenolok kémiai szerkezetük szerint a katekinek, más néven flavan-3-olok csoportjába tartoznak. Jellemzőjük a katekinváz jelenléte, melyet egy dihidropirán heterociklusos és két fenolos gyűrű alkot. A flavanolok a gallo- és gallátcsoport jelenlétében vagy hiányában, valamint a gallo csoport kötésének konfigurációjában különböznek egymástól (4. ábra). A zöld tea mennyiségileg legjelentősebb és legtöbbet vizsgált katekinje az (-)-epigallokatekin-3-gallát (EGCG) [82].

A flavanolok antioxidáns tulajdonságuk miatt is az egészségmegővés szempontjából előnyös összetevői táplálékunknak. Ugyanakkor számos vizsgálat bizonyítja, hogy a széleskörű jótékony hatások nemcsak az általános antioxidáns aktivitás következményei, hanem a flavanolok specifikus pontokon is kedvezően hatnak szervezetünk működésére. Az intenzív kutatások az előnyös egészségi hatások létrejöttének több lehetséges mechanizmusát is feltárták. Továbbra sem tisztázott azonban, hogy az *in vitro* és az állatkísérletek során tapasztalt hatások közül melyek játszanak valójában szerepet a korábban említett betegségek megelőzésében [83].

Az elmúlt évek vizsgálatai azt is megmutatták, hogy a katekinek megoszlása a sejten belül nem egyenletes. Az EGCG egyes sejtalkotókban, nagy valószínűséggel a mitokondriumban és az ER-ben, feldúsul [84, 85].



4. ábra: A fontosabb katekinek szerkezete

A katekinvázat két fenolos gyűrű (A és B gyűrű) és egy dihidropirán heterociklusos gyűrű (C gyűrű) alkotja. A gallokatekinek a B-gyűrűn nem kettő, hanem három vicinális hidroxilcsoportot hordoznak (zölddel jelölve). A katekin-gallátok esetében a dihidropirán gyűrű 3-as hidroxilcsoportját galluszsav (3,4,5-trihidroxi-benzoészav) észteresíti (narancssárgával jelölve). A katekinek a fenti funkciós csoportokon felül a B gyűrű konfigurációjában különböznek egymástól.

A zöld tea az utóbbi organellek működését több ponton is befolyásolja. A fehérjék érését az EGCG a glukozidáz II enzim gátlásán keresztül hátráltatja [86], ami ER-stresszhez és apoptózishoz vezethet [87, 88]. Az ER-stressz szerepét több kórfolyamatban,

így a tumorgenezisben is kimutatták, modulálását ma a daganatellenes terápia egyik lehetséges célpontjának tartják [89].

Az ER-stressz részeként az ER kalciumraktárai kiürülnek [90], ugyanakkor a lumenális kalciumdepléció maga is ER-stresszhez vezethet [91]. Az EGCG több mechanizmussal, sejttípusonként eltérő módon befolyásolja a sejt kalcium homeosztázisát. A vérlemezkékben a foszfolipáz C aktivációját fékezve a kalciumraktárak mobilizációját gátolja, ami az EGCG antitrombotikus hatásának egyik magyarázata lehet [92]. Más sejtekben ezzel szemben a flavanol az ER kalciumdeplécióját okozta [93-95], ami ER-stresszen keresztül apoptózist válthat ki, és így hozzájárulhat a zöld tea tumorellenes hatásához.

A zöld tea antidiabetikus hatásait is részben az ER-ben zajló folyamatok modulálásával fejtik ki. Az EGCG a mikroszomális glukóztranszport gátlásán keresztül akadályozza az ER lumenében elhelyezkedő glukóz-6-foszfátáz enzim működését, ami közvetlenül hozzájárulhat a glukóztermelés csökkenéséhez [96]. A katekin továbbá a kortizon-kortizol átalakuláshoz szükséges lumenális redukált NADPH-t NADP⁺-vé oxidálja, így bizonyos sejtekben, elsősorban a zsírszövetben, a kortizon prereceptorális aktiválását is gátolja [97].

Az ER lumenében működik a biotranszformáció több enzime, így az UGT és a β -glukuronidáz is. Ahogy a korábbiakban részletesen tárgyaltuk, a glukuronidáció és a deglukuronidáció sebessége a karcinogenezis fontos tényezője. A β -glukuronidáz fokozott aktivitása a karcinogén vegyületek reaktivációját eredményezi, és rosszindulatú daganatok kialakulására hajlamosít [45, 46]. Ennek megfelelően a deglukuronidáció gátlószerei kemopreventív hatással rendelkeznek [50]. Elképzelhető, hogy a zöld tea flavanolk az ER-ben zajló biotranszformációs folyamatokat is befolyásolják, és ismert daganatmegelőző hatásukat részben a deglukuronidáció fékezésén keresztül fejtik ki.

6. Célkitűzések

A transzport folyamatok a lumenális aktív centrummal rendelkező enzimek működését jelentősen modulálják. Számos esetben a folyamat sebességmeghatározó tényezőjeként szolgálnak, így az UGT-k esetében az UDP-glukuronsav [34], a mikroszomális β -glukuronidáz esetében a glukuronid felvételének ütemétől függ az enzim aktivitása [51].

Annak ellenére azonban, hogy az UDP-glukuronsav a különböző UGT-k közös kofaktora, az UGT izoenzimek között mégis eltérő mértékű latenciát tapasztalunk. Elképzelhető tehát, hogy egyes esetekben nemcsak az UDP-glukuronsav felvétele, hanem egyéb tényezők is szerepet játszanak az UGT-k latenciájának kialakításában.

Korábban leírták, hogy a különböző glukuronidok eltérő sebességgel lépik át a mikroszómamembránt. Feltűnő például a nagyméretű, rigid struktúrájú morfin-glukuronidok rendkívül lassú mikroszomális felvétele [52]. A lomha transzport felveti annak a gyanúját, hogy a morfin-glukuronidáció során keletkező konjugátum a lumenben reked. A termék akkumulációja esetleg a morfin-UGT működését is fékezheti, így hozzájárulva az enzim latenciájához.

A biotranszformációban betöltött fontos szerepük ellenére a glukuronidtranszportot végző fehérjéket mindmáig nem azonosították, és működésükről igen keveset tudunk. Nem ismert specifikus gátlószerek sem.

Munkánk során a glukuronidtranszport funkcionális vizsgálatait végeztük, ezzel szeretnénk volna közelebb kerülni az oly kevésbé ismert, ámde fontos feladatot ellátó fehérjék megismeréséhez. Megvizsgáltuk, hogy az M3G lassú transzportja az *in situ* keletkező konjugátum lumenális felhalmozódásához vezet-e. Emellett kerestük a glukuronidtranszport lehetséges gátlószereit. Irodalmi adatok alapján az ilyen hatóanyagok a β -glukuronidáz közvetett gátlása révén a karcinogén vegyületek reaktiválódását is csökkenthetik, tehát kemopreventív hatással bírhatnak. Ismert, hogy a zöld tea flavanoltjai számos daganat kialakulását megelőzik. Kíváncsiak voltunk tehát arra, vajon ehhez a jótékony hatáshoz a deglukuronidáció gátlása is hozzájárulhat-e. Megvizsgáltuk ezért, hogyan befolyásolják a zöld tea katekinek a β -glukuronidáz enzim és a glukuronidtranszport aktivitását.

7. Módszerek

7.1. Patkány máj mikroszóma készítése

A mikroszómát frakcionált centrifugálással [98], 180-230 g testtömegű, egy éjszakán keresztül éheztetett, hím Wistar patkányok májából állítottuk elő. Az izolált, feldarabolt májat jéghideg szacharóz-HEPES puffer oldatban (0,3 M szacharóz, 20 mM HEPES, pH 7,0), Potter-Elvehjem készülék alkalmazásával homogenizáltuk. A kapott homogenátumot a fenti oldatban ötszörösére hígítva felszuszpendáltuk, majd megkezdtük a frakcionált centrifugálást. Ennek első lépése során (1000 x g, 10 perc, 4°C) különválik a homogenizálásnak ellenálló kötőszövet, valamint a sejtmag, ezek képezik az eldobható üledéket. A felülúszót tovább centrifugálva (11 000 x g, 20 perc, 4°C) leülepszik a mitokondriális frakció, amely a peroxiszómát és a lizoszómát is tartalmazza. A harmadik lépés ultracentrifuga segítségével történik (100 000 x g, 60 perc, 4°C), ekkor az előző lépésben kapott felülúszóból a mikroszóma frakció ülepedik le.

A kapott pelletet a felülúszóéval nagyjából megegyező térfogatú MOPS-KCl pufferben (100 mM KCl, 20 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM MOPS, pH 7,2) szuszpendáltuk, majd az ultracentrifugálást változatlan paraméterekkel megismételtük. Ezt követően az üledéket 50 mg/ml körüli fehérjekoncentrációt beállítva ismét MOPS-KCl pufferben vettük fel, majd azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és felhasználásig ott tároltuk.

A preparátum fehérjetartalmát ismert koncentrációjú marha szérum albumin oldathoz hasonlítva határoztuk meg, részben BioRad fehérjemérő reagens segítségével, a gyártó utasítása szerint, részben pedig Lowry és mtsai. metodikája szerint [99].

A mikroszóma tisztaságát marker enzim vizsgálatok segítségével ellenőriztük [100]. A mikroszomális membrán integritását a mannóz-6-foszfátáz latenciájának mérésével bizonyítottuk, mely 95% felett volt [101].

A fenti módszer alkalmazásakor az ER membránjából apró vezikulumok keletkeznek, melyek eredeti orientációjukat megtartják, és sértetlen marad a luminális mikrokörnyezet is. A marker enzimek vizsgálata többszörösen alátámasztja, hogy májszövet esetén a mikroszóma frakciót szinte kizárólag ezek a vezikulumok alkotják, így a máj mikroszóma kiválóan alkalmas az ER folyamatainak *in vitro* vizsgálatára.

Kísérleteinket részben intakt, részben permeabilizált mikroszómán végeztük. Utóbbi esetben a mintához 0,1 mg/mg mikroszomális fehérje koncentrációban alamecint adtunk. Ez a 20 aminosavból álló peptid a membránba épülve azon pórusokat formál, így a vezikulumok szétroncsolása nélkül a membránt szabadon átjárhatóvá teszi [102].

7.2. Sejtenyészet fenntartása, kezelése

Az alkalmazott Hepa 1c1c7 egér hepatoma sejtek monolayerben, 37 °C-on, 95% légköri levegő és 5% CO₂ mellett, 10% FBS-sel (fetal bovine serum), glutaminnal és penicillin-streptomycinnel kiegészített α -MEM (minimum essential medium) tápfolyadékban növekedtek. Az enzimaktivitás-mérésekhez a konfluens sejtekből tripszin alkalmazásával szuszpenziót készítettünk, és ezt 10⁷ sejt/ml koncentrációra hígítottuk. A kontroll és az alamecinnel (0,2 mg/ml) kezelt sejteket elkülönítve 37 °C-on 5 percig inkubáltuk [34]. A sejteket ezután centrifugáltuk (250 x g sebességgel, 4 percig), majd PBS-sel (phosphate buffered saline) végzett mosás után szérumentes α -MEM oldatban reszuszpendáltuk 5·10⁶ sejt/ml koncentrációban.

7.3. A glukuronidáz aktivitás mérése

A β -glukuronidáz aktivitását intakt és alamecinnel permeabilizált patkány máj mikroszómán és egér Hepa 1c1c7 hepatoma sejteken mértük. Az enzimaktivitást a modell szubsztrátként használt MUGA (4-metilumbelliferil-glukuronid) enzimatis hidrolízise során keletkező MUMB (4-metilumbelliferon) keletkezésének sebességéből számítottuk.

A mikroszómát 0,5 mg fehérje/ml koncentrációban alkalmazva MOPS-KCl pufferben 37 °C-on 10 percig inkubáltuk különböző koncentrációjú (10 μ M-tól 1 mM-ig) MUGA jelenlétében.

Az intracelluláris aktivitás méréséhez a sejteket 5·10⁶ sejt/ml koncentrációban szérumentes α -MEM tápoldatban vettük fel, majd 37 °C-on, 0,2 mM MUGA jelenlétében inkubáltuk. A vizsgált flavanoloikat (EGCG, GCG, EGC, GC, ECG, EC) már 1 perccel a szubsztrát hozzáadását megelőzően a mikroszómához, illetve a sejtsuszpenzióhoz adtuk. A mikroszomális rendszerben a fenti flavanokok mindegyikét vizsgáltuk, sejteken csak az EGCG hatását tanulmányoztuk. Az EGCG által kifejtett gátlás

koncentrációfüggését 10 μM és 400 μM között tanulmányoztuk mikroszómán, 50 μM MUGA mellett.

A reakciót minden esetben háromszoros térfogatú jéghideg metanol hozzáadásával állítottuk le. Ezután a mintákat azonnal lefagyasztottuk, és $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk a további vizsgálatig. A HPLC analízishez a felolvasztott mintákat centrifugáltuk (20 000 x g, 10 perc, $4\text{ }^\circ\text{C}$), majd az így kapott fehérjementes felülúszó MUMB-tartalmát meghatároztuk.

Az enzimaktivitást az 1 perc alatt 1 mg mikroszomális fehérje vagy 10^6 sejt által előállított termék (MUMB) mennyisége (pmol-ban vagy nmol-ban kifejezve) alapján számszerűsítettük. A reakció során keletkezett MUMB mennyiségét az inkubáció végén mért és a kezdeti érték különbségeként határoztuk meg; utóbbi az inkubáció végén mért értéknek kevesebb, mint 5%-át tette ki.

A permeabilizált és az intakt mintákon végzett mérések során kapott enzimaktivitások különbségét az előbbi százalékában kifejezve meghatároztuk a latencia mértékét.

7.4. A morfin glukuronidáció vizsgálata

A morfin UGT aktivitását 1 mg fehérje/ml koncentrációjú patkány máj mikroszómán mértük. A vezikulumokat $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on, feleslegben adott (2 mM) UDP-glukuronsavat, 10 mM szacharolaktont és változó koncentrációjú (50, 100 vagy 200 μM) morfin tartalmazó MOPS-KCl pufferben inkubáltuk 5 percig. Ugyanezekkel a paraméterekkel megmértük a glukuronidáció sebességét alameticinnel permeabilizált mikroszómán is. A glukuronidázgátló szacharolakton törzsoldatát (40 mM) MOPS-KCl pufferben készítettük el, s a pH beállítása után négyszeres hígításban adtuk a mintához. Az alkalmazott koncentrációkat és az inkubációs időt a mérés gondos optimalizálását követően választottuk ki. Előzőleg azt tapasztaltuk, hogy az M3G mennyisége 60 percen keresztül lineárisan nő mind intakt, mind permeabilizált mikroszómában. Így a fenti paraméterek mellett az M3G képződésének kezdeti sebességét mérhetjük.

Az inkubáció végeztével külön-külön megmértük a teljes minta, valamint a vezikulumok M3G-tartalmát is. Az előbbi esetben a reakciót a mintával azonos térfogatú 100%-os acetonitril hozzáadásával állítottuk le, majd az M3G mennyiséget LC-MS analízissel határoztuk meg (lásd lejjebb). Megmértük a minták M3G-tartalmát az inkubáció

végén és annak kezdetén (az utóbbi minden esetben kevesebbnek adódott, mint az előbbi 2%-a). A kettő különbsége adta az inkubáció során keletkezett M3G mennyiséget. Az enzimaktivitást az 1 perc alatt 1 mg mikroszomális fehérje által termelt M3G mennyiségeként (pmol-ban kifejezve) definiáltuk. A permeabilizált és az intakt membrán mellett kapott eredmények különbségéből kiszámoltuk az enzim latenciáját. A vezikulumokhoz asszociált (a membránhoz kötött plusz a lumenbe zárt) M3G meghatározását a transzportmérések során is alkalmazott gyorszűrés segítségével végeztük el. 100 µg mikroszomális fehérjét tartalmazó mintát cellulóz-acetát/nitrát membránon (MF Millipore, 0,45 µm pórusméret) leszűrtünk, a membránt 3 ml jéghideg MOPS-KCl pufferrel átmostuk. A filteren fennmaradt M3G-ot 50%-os acetonitril segítségével extraháltuk, majd ezúttal is LC-MS segítségével mértük meg.

7.5. Glukuronidtranszport-mérés

Transzportméréseinkhez a gyorszűrés, más néven rapid filtráció módszerét alkalmaztuk. Az eljárás lényege, hogy különböző időtartamú, befelé vagy kifelé irányuló transzmembrán glukuronidáramlás után a mikroszómamintát megfelelő pórusméretű filteren átszűrjük. A mikroszóma vezikulumai a filteren fennakadnak, míg a vezikulumokhoz nem asszociált glukuronidokat mosással eltávolítjuk. Kísérleteink során cellulóz-acetát/nitrát membránt (MF Millipore, pórusméret 0,22 µm, illetve 0,45 µm) használtunk, melyen a leszűrt mintákat még jéghideg MOPS-KCl pufferrel is átmostuk. A filterről a glukuronidokat 500 µl 50%-os acetonitrillel oldottuk le, majd a mintákat fagyasztva tároltuk a további analízis elvégzéséig. Mérés előtt centrifugálás segítségével a mintában található fehérjéket és a filter maradványait leülepítettük, a felülúszó glukuronidtartalmát pedig MUGA esetében HPLC, M3G esetében LC-MS segítségével mértük meg (részletesen lásd lejjebb).

A méréseket alameticinnel előkezelt mikroszómán is elvégeztük, így a vezikulumok membránjához – részben aspecifikusan – kötődő glukuronid mennyiségét tudtuk megmérni. A lumen glukuronidtartalmát az intakt és a permeabilizált mikroszómán kapott eredmények különbségeként kaptuk.

A transzport aktivitását az 1 perc alatt a mikroszómába felvett vagy onnan leadott glukuronid mennyisége (MUGA esetében nmol-ban, M3G esetében pmol-ban kifejezve) adta, 1 mg mikroszomális fehérjére vonatkoztatva.

A mikroszómát a transzportmérések előtt a glukuronidázgátló szacharolaktonnal (10 mM) előkezeltük, hogy a glukuronidok enzimatis hidrolízise eredményeinket ne hamisítsa meg [103].

7.5.1. Az M3G transzportjának mérése

A mikroszóma M3G-felvételét és leadását 37 °C-on vizsgáltuk. Kifelé vagy befelé irányuló koncentrációgradiens létrehozása után különböző időpontokban meghatároztuk a lumen glukuronidtartalmát.

A glukuronidbeáramlás méréséhez 10 mM szacharolaktont tartalmazó MOPS-KCl oldatban 1 órán keresztül előkezeltük a mikroszómát, majd M3G hozzáadásával indítottuk a transzportot. A mérés optimalizálása céljából végzett vizsgálataink azt mutatták, hogy 0,5 mg/ml és 10 mg/ml közötti mikroszóma koncentrációk alkalmazása esetén a glukuronidfelvétel egyenesen arányos a fehérjekoncentrációval. Méréseinkhez 1 mg/ml fehérjekoncentrációt választottunk. Az M3G-felvétel időfüggésének vizsgálatához 50 μ M glukuronid hozzáadása után, a feltüntetett időpontokban (0 másodperc és 100 perc között) mértük a luminális glukuronid mennyiségét. A transzport koncentrációfüggésének vizsgálatához különböző koncentrációjú (0-200 μ M) M3G-ot adtunk a mikroszómához, és 1 perc inkubáció után határoztuk meg a glukuronidfelvétel kezdeti sebességét.

Az M3G-kiáramlás méréséhez a mikroszóma lumenét M3G-vel feltöltöttük: a mikroszómát (10 mg/ml) 50 μ M M3G-ot és 10 mM szacharolaktont tartalmazó MOPS-KCl oldatban 100 percig inkubáltuk. A glukuronidleadás indításához a mintát húszszorosra hígítottuk 10 mM szacharolaktont tartalmazó MOPS-KCl oldatban, ezzel kifelé irányuló koncentráció gradienst hozva létre.

Az ábrákon feltüntetett időpontokban 100 μ g fehérjét tartalmazó mintákat vettünk az inkubációs elegyből. A mikroszómát a fent leírt módszer szerint leszűrtük, 3 ml jéghideg MOPS-KCl oldattal mostuk, acetonitrillel kezeltük, majd lefagyasztottuk. A minták M3G-tartalmát felolvasztás és centrifugálás (14 000 x g, 6 perc) után a felülúszóból LC-MS alkalmazásával határoztuk meg.

7.5.2. Az EGCG glukuronidtranszportra gyakorolt hatásának vizsgálata

Az EGCG mikroszomális glukuronidfelvételére gyakorolt hatásának vizsgálatához modell szubsztrátként a viszonylag gyorsan transzportálódó és könnyen detektálható MUGA-t használtuk. A mikroszómát (2 mg/ml fehérje) 25 °C-on MOPS-KCl pufferben 2 mM glukuronid és 10 mM szacharolakton jelenlétében inkubáltuk. A flavanolak hatásának tanulmányozásához az EGCG-t 1 perccel a MUGA hozzáadása előtt kevertük a mintához. A glukuronidfelvétel időfüggését 200 µM EGCG mellett határoztuk meg. Az EGCG hatásának koncentrációfüggését is vizsgáltuk, ehhez a vegyületet 0 és 400 µM közötti koncentrációban adtuk a mikroszómához.

A megadott időpontokban (0 másodperc és 10 perc között) az inkubált mintából 200 µg fehérjét tartalmazó frakciókat vettünk, és ezeket gyorsszűréssel elválasztottuk, majd 2 ml jéghideg MOPS-KCl oldattal mostuk. A glukuronidokat a filterről acetronitril alkalmazásával eltávolítottuk, fagyasztva tároltuk. Felolvasztás után a mintákat centrifugáltuk (20 000 x g, 10 perc, 4 °C), majd az immáron fehérjementes felülúszó MUGA-tartalmát HPLC segítségével megmértük.

7.6. A MUMB és a MUGA mennyiségének mérése nagy teljesítményű folyadék-kromatográfia (high performance liquid chromatography, HPLC) segítségével

A MUMB és a MUGA mennyiségének meghatározásához a fehérjementes felülúszó komponenseit Waters Alliance 2690 típusú HPLC segítségével, Nucleosil 100 C18-as oszlopon (5 µm 25 x 0,46, Teknokroma), gradiens elúcióval választottuk szét.

A MUMB eluálását 0,9 ml/perc áramlási sebességgel végeztük, eluensként 0,1%-os trifluorecetsav oldat (A oldat) és 0,1% trifluorecetsavat tartalmazó metanol (B oldat) változó arányú elegyét használtuk. Az első 30 másodpercben a mozgó fázist 80% A és 20% B oldat keveréke alkotta, majd a következő 7 perc alatt a két oldat arányát lineárisan megváltoztattuk 40%-60%-ra. Két percen keresztül ez az elegyet áramoltattuk keresztül az oszlopon, majd az eredeti 80%-20%-os arányt visszaállítottuk. A MUMB fluoreszcenciáját 325 nm-es excitációs hullámhossz, 455 nm-es emissziós hullámhossz mellett detektáltuk, Waters Multi λ Fluorescence Detector 2475 segítségével.

A MUGA esetében a mozgó fázist 0,1%-os trifluorecetsav oldat (A oldat) és 0,1% trifluorecetsavat tartalmazó acetonitril (B oldat) változó arányú elegye alkotta. Az első egy percben 100% A oldat segítségével végeztük az elúciót, majd a mozgó fázist egy perc alatt lineárisan 85% A és 15% B oldat elegyére cseréltük. 14 percen keresztül ezt az eluent alkalmaztuk, majd visszaállítottuk az A oldat kezdeti 100%-os arányát. 1 ml/perc áramlási sebességet alkalmaztunk. A MUGA abszorbanciáját 317 nm-es hullámhosszon detektáltuk Waters Dual λ Absorbance Detector 2487 segítségével.

A retenciós időket mindkét esetben standard minta analízisével határoztuk meg. A MUMB és MUGA mérési interferenciáját a két vegyületet együttesen tartalmazó standard oldatok vizsgálatával zártuk ki.

7.7. Az M3G mennyiségének mérése folyadékkromatográfia – tömegspektrometria (liquid chromatography – mass spectrometry, LC-MS) segítségével

A morfinglukuronidáció és az M3G-transzport vizsgálata során kapott, 50% acetonitrilt tartalmazó minták glukuronidtartalmát LC-MS alkalmazásával mértük meg az irodalomban korábban ismertetett metodika szerint [7]. Röviden: a minta komponenseit első lépésben HPLC (Aligent HP1100 LC system, Aligent Technologies) segítségével ODS2 oszlopon, 0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitril növekvő gradiensevel elválasztottuk. Az eluátumot közvetlenül tömegspektrométerbe (Micromass LC Quattro, Micromass) injektáltuk, és az M3G-t electrospray és multiple reaction monitoring alkalmazásával pozitív ionizációs módban detektáltuk. Az alkalmazott LC-MS módszer előzetes validálása alapján a futtatások közötti eltérések 5% alattinak bizonyultak.

7.8. Statisztikai analízis

Az eredmények kiértékeléséhez, a lineáris és nemlineáris regresszióhoz, valamint a statisztikai analízishez GraphPad Prism® szoftvert használtunk. A kinetikai paramétereket (K_m , v_{max}) a Michaelis-Menten egyenlet alapján számoltuk. Az IC_{50} és K_i értékének számításához az enzimaktivitást az EGCG-koncentráció logaritmusának függvényében ábrázoltuk, majd ebben a féllogaritmosos ábrázolásban szigmoid dózis-hatás görbét illesztettünk az általunk kapott mérési eredményekre és meghatároztuk a $logEC_{50}$ értéket

[104]. Minden vizsgálat során legkevesebb három párhuzamos mérést végeztünk, és a kísérleteket legalább három alkalommal végrehajtottuk. Az eredményekből átlagot számoltunk és meghatároztuk a szórás (standard deviation, SD) értékét. Az adatokat ANOVA módszer szerint analizáltuk, és Dunnett többszörös összehasonlítási „post hoc” vizsgálatnak vetettük alá. $P < 0,01$ eltérést tekintettünk szignifikánsnak.

8. Eredmények

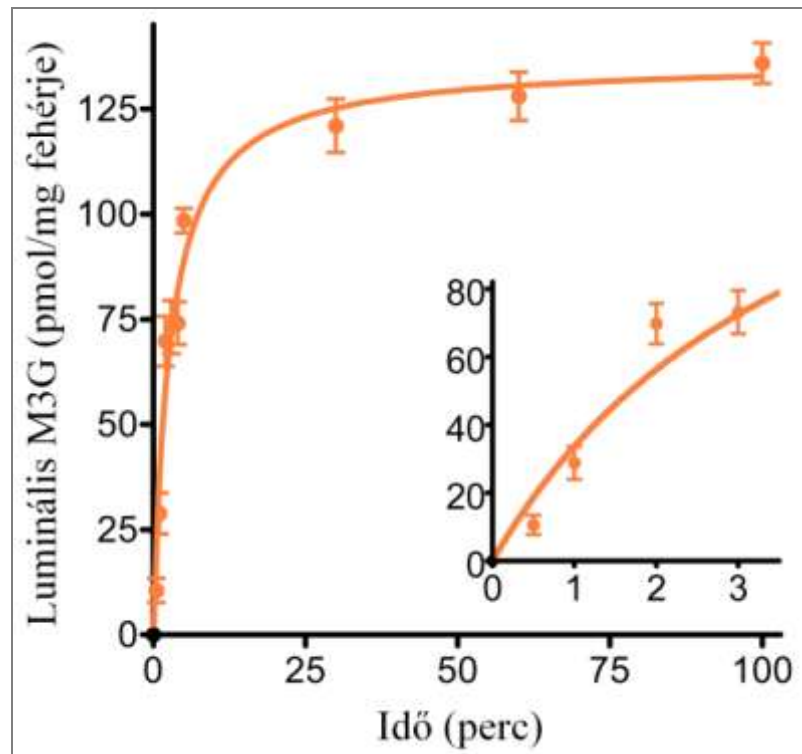
8.1. Az *in situ* keletkező morfin-3-glukuronid lumenális akkumulációjának vizsgálata

Munkánk első részében az M3G-transzport jellemzőit tanulmányoztuk. Megvizsgáltuk az M3G felvételének és leadásának idő- és koncentrációfüggését. Meghatároztuk a lumen M3G-tartalmát olyan kísérleti körülmények között, mikor a hosszú inkubációs időnek köszönhetően az extravezikulárisan adott M3G és a lumen glukuronidkoncentrációja kiegyenlítődik. Ezután megmértük az *in situ* morfin glukuronidáció során keletkező M3G mennyiséget, és meghatároztuk a morfin UGT latenciáját. Következő kísérletünkben megvizsgáltuk, hogy a morfin glukuronidáció során keletkező M3G mekkora hányada helyezkedik el a lumenben. A morfin glukuronidáció során észlelt lumenális M3G-mennyiséget összevetettük azzal a lumenális mennyiséggel, amit kívülről adott M3G esetében, az egyensúlyi helyzet beállta után detektáltunk.

8.1.1. Az M3G-felvétel és leadás időfüggésének vizsgálata patkány máj mikroszómán

Az M3G beáramlásának időfüggését patkány máj mikroszómán, 37 °C-on, 1 mg/ml-es fehérjekoncentráció mellett vizsgáltuk. Az intakt mikroszómát 50 µM M3G-vel inkubálva növekvő inkubációs idők mellett a vezikulumok glukuronidtartalmának markáns növekedését tapasztaltuk. Az intakt mikroszómához asszociált glukuronid mennyiségét a lumenben található és a membránhoz – részben aspecifikusan – kötődő M3G együttesen adja, ezért a transzport sebességének meghatározásához szükséges intraluminális frakció számításához alameticinnel permeabilizált mikroszómán is elvégeztük a méréseket. A pórusképző alameticin a membránt az M3G számára szabadon átjárhatóvá teszi, így gyorszűrés és mosás után a vezikulumok lumenében nem marad glukuronid. Ennek köszönhetően permeabilizált mikroszómán végzett méréssel a mikroszómamembránhoz kötődő M3G mennyiségét határozzuk meg. Az intraluminális glukuronid mennyiségét az intakt és a permeabilizált mikroszómán kapott eredmények különbsége adja. A membránhoz kötődő M3G mennyisége 30 másodperc alatt elérte az egyensúlyi értéket ($70,99 \pm 9,23$ pmol/mg fehérje), majd a 100 perces inkubáció hátralévő ideje alatt

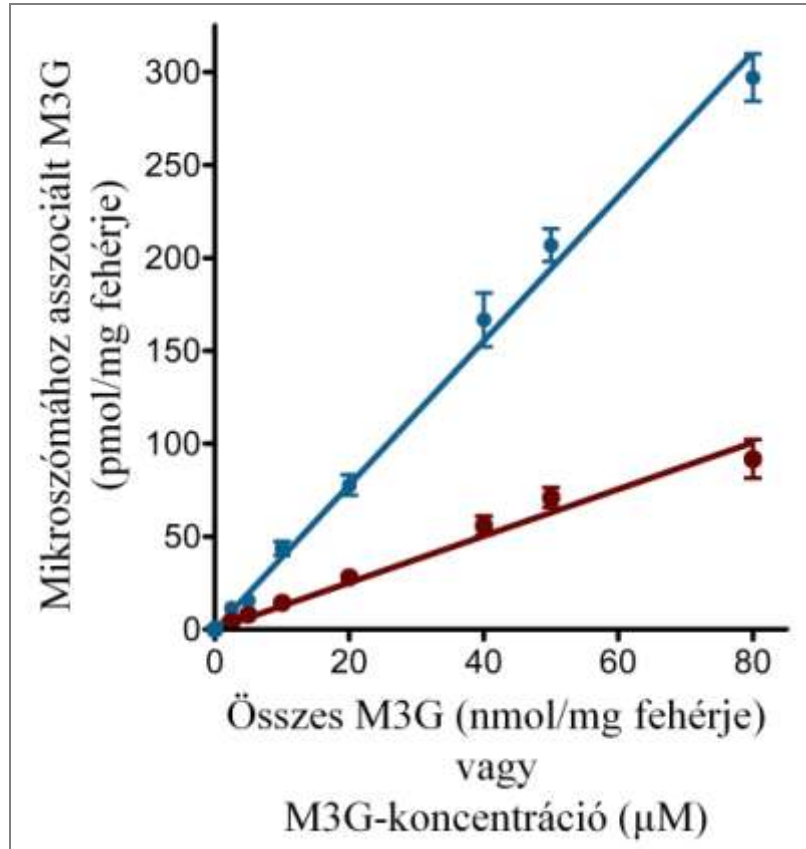
változatlan maradt. A luminális glukuronid mennyisége azonban a mérés első 3 percében közel lineáris növekedést mutatott, és csak körülbelül 30 perc után érte el az egyensúlyi állapotot (5. ábra). Az eredmények alapján későbbi méréseinkhez az M3G-felvétel kezdeti sebességének vizsgálatakor 1 perces inkubációs időt választottunk, míg az M3G-kiáramlás tanulmányozásakor a mérés előtt végzett 100 perces inkubációval biztosítottuk az intra- és extraluminális glukuronidkoncentráció kiegyenlítését.



5. ábra: Az M3G felvételének időfüggése patkány máj mikroszómában

A mikroszómát (1 mg/ml) 50 μ M M3G jelenlétében inkubáltuk. A feltüntetett időpontokban mintát vettünk, és gyorszűrés után LC-MS segítségével mértük a vezikulumok glukuronidtartalmát. A luminális M3G mennyiségét az intakt és a permeabilizált mikroszómán kapott eredmények különbségeként számoltuk. A görbe kezdeti szakasza (az első három perc) kinagyítva is látható.

(három mérésből számolt átlag \pm szórás)



6. ábra: A mikroszómához asszociált és a minta teljes M3G-tartalma közötti összefüggés egyensúlyi állapotban

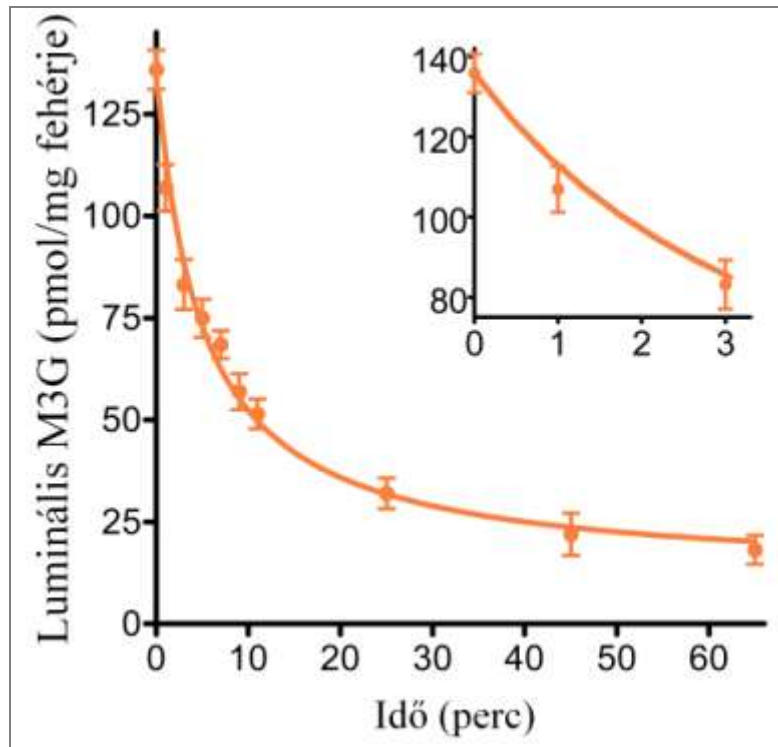
Intakt (kék) és permeabilizált (bordó) mikroszómát (1 mg/ml) különböző koncentrációjú M3G jelenlétében 100 percig inkubáltunk. Ennyi idő alatt mind a mikroszóma glukuronidfelvétele, mind az M3G membránhoz kötődése egyensúlyi állapotot ér el. Gyorsszűrés után LC-MS segítségével mértük a vezikulumok glukuronidtartalmát, ezek értékét a minta teljes M3G-mennyiségének függvényében ábráztuk. (Az 1 mg/ml fehérjekoncentráció miatt a vízszintes tengelyen 1 nmol/mg fehérje M3G az inkubációs elegyben 1 µM koncentrációnak felel meg.)
(három mérésből számolt átlag ± szórás)

További méréseink szempontjából fontos tisztázni, hogy az intakt és permeabilizált mikroszómához asszociálódó M3G aránya esetleg függ-e az alkalmazott glukuronidkoncentrációtól. A hosszú inkubáció során létrejövő egyensúlyi helyzetet tehát ebből a szempontból további vizsgálatnak vetettük alá, azaz meghatároztuk az intakt, illetve permeabilizált mikroszóma egyensúlyi glukuronidtartalmát különböző

extravezikuláris glukuronidkoncentrációk alkalmazása esetén. A mikroszómát M3G hozzáadása után 100 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd gyorszűrést követően LC-MS segítségével mértük a vezikulumokhoz asszociált glukuronid mennyiségét. A mért érték és az inkubáció során alkalmazott glukuronidkoncentráció között mind intakt, mind alameticinnel kezelt mikroszóma esetében egyenes arányosságot tapasztaltunk (6. ábra). Az intakt és a permeabilizált mikroszómán kapott eredmények különbségeként definiált luminális glukuronidmennyiség tehát szintén egyenes arányosságban áll a glukuronidkoncentrációval. A kísérleteinkben mért luminális és extravezikuláris M3G-mennyiségek átlagos aránya $2,63 \pm 0,04$ pmol/nmol-nak bizonyult. Amennyiben elfogadjuk, hogy a 100 perces inkubáció végére az intra- és extravezikuláris glukuronidkoncentráció kiegyenlítődik, a kettő arányából a vezikulumok lumenének térfogata is kiszámítható. Az alkalmazott 1 mg/ml-es fehérjekoncentrációval számolva a luminális térfogat $2,63 \mu\text{l}/\text{mg}$ fehérje értékűnek adódik.

Az M3G vezikulumokból történő kiáramlásának vizsgálatához tehát a mérés előtt 100 percig $50 \mu\text{M}$ glukuroniddal előinkubálva töltöttük fel a mikroszómát. Ezt követően az M3G-kiáramlást a vezikulumok hűszoros hígításával létrehozott, kifelé irányuló koncentrációgradiens kialakításával indítottuk meg. A lumen glukuronidtartalmát ezúttal is intakt és permeabilizált mikroszómán végzett párhuzamos kísérletek segítségével, a két mérés eredményének különbségeként határoztuk meg az egyes időpillanatokban. A valódi kiindulási érték (a vezikulumok glukuronidtartalma a kihígítás pillanatában) meghatározása technikai okokból nem lehetséges, tekintettel a mérési eljárás (a minták összekeverése, majd szűrése) időigényére. Korábban a mikroszóma glukuronidfelvételének vizsgálatakor azonban meghatároztuk az $50 \mu\text{M}$ M3G-vel 100 percig inkubált minta glukuronidtartalmát. Ennek értéke ($135,87 \pm 8,39$ pmol/mg fehérje) közel megegyezik azzal, amit a glukuronidleadás vizsgálatakor mért adatokra illesztett görbéből (7. ábra) extrapolálhatunk ($127,31$ pmol/mg fehérje). Az M3G-kiáramlás időfüggésének tanulmányozásához ezért ezt az értéket kiindulási értéknek elfogadtuk. A luminális glukuronid mennyisége az első 3 percben közel lineárisan csökkent, az egyensúlyi helyzet pedig 45 perc után állt be (7. ábra). Az M3G be- és kiáramlásának időbeni lefutása tehát nagyon hasonló képet mutat, ami összhangban áll a korábbi eredményekkel, melyek szerint a glukuronidok kétirányú, facilitált diffúzió segítségével jutnak át az ER membránján. A befelé, valamint a kifelé irányuló transzport kezdeti sebességét az 1 perces eredményekből

számoltuk ki, és a két érték lényegében megegyezett (rendre $28,84 \pm 8,41$, valamint $28,94 \pm 7,67$ pmol/perc/mg fehérje).

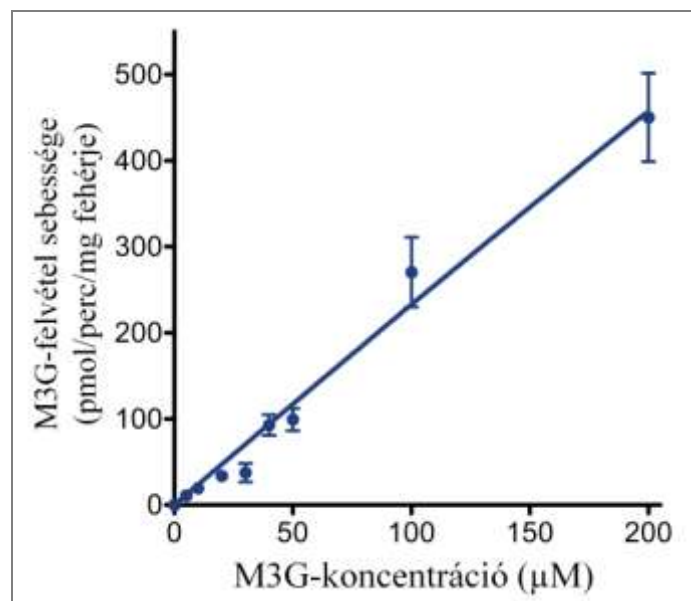


7. ábra: Az M3G leadásának időfüggése patkány máj mikroszómában

A mérést megelőző, 100 perces inkubáció során a mikroszomális vezikulumokat (1 mg/ml) feltöltöttük 50 μ M M3G-vel. Az egyensúly beállta után mérhető luminális M3G-mennyiséget korábban meghatároztuk ($135,87 \pm 8,39$ pmol/mg fehérje), az M3G-leadás vizsgálatokor ezt az értéket tekintettük kiindulási (0 mp-es) értéknek. A minta húszszoros hígításával hoztunk létre kifelé irányuló koncentrációgradienst, melynek hatására az M3G-kiáramlás megindult. A feltüntetett időpontokban gyorsszűrés és LC-MS segítségével mértünk a vezikulumok M3G-tartalmát. Intakt és permeabilizált mikroszómában párhuzamosan végzett mérések különbségeként határoztuk meg a luminális M3G mennyiségét. A görbe kezdeti szakasza (az első három perc) kinagyítva is látható. (három mérésből számolt átlag \pm szórás)

8.1.2. Az M3G felvételének koncentrációfüggése

Az M3G-transzport kinetikai jellemzőinek vizsgálatához a glukuronidfelvétel kezdeti sebességét mértük különböző (5 és 200 μM közötti) extravezikuláris glukuronidkoncentrációkat alkalmazva. A mikroszóma glukuronidtartalmát 1 perces inkubáció után mértük mind intakt, mind alameticinnel permeabilizált mikroszómán, és a lumenális glukuronid mennyiségét a két érték különbségeként számoltuk ki. A transzport sebességét az alkalmazott glukuronidkoncentráció függvényében ábrázolva lineáris összefüggést észleltünk a vizsgált tartományban (8. ábra), mely egy kis affinitású, nagy kapacitású transzport mechanizmusra utal. A transzporter fehérje telítéséhez szükséges glukuronidkoncentrációt nem tudtuk alkalmazni a minták inkubálása során, a telítést még megközelíteni sem tudtuk az M3G oldhatósági tulajdonságai miatt.



8. ábra: A mikroszomális M3G-transzport koncentrációfüggése

A mikroszómát (1 mg/ml) különböző koncentrációjú (0-200 μM) M3G-vel inkubáltuk, és az M3G-felvétel kezdeti sebességének meghatározásához 1 perc után gyorsaszűrés és LC-MS segítségével mértük a vezikulumok glukuronidtartalmát. Intakt és permeabilizált mikroszómán párhuzamosan végzett mérések különbségeként határoztuk meg a lumenális M3G mennyiségét.

(három mérésből számolt átlag \pm szórás)

8.1.3. Morfinglukuronidáció intakt és permeabilizált mikroszómában

A morfin UGT enzim latenciájának vizsgálatához az M3G-szintézis sebességét mértük intakt és alameticinnel kezelt mikroszómán. A különböző koncentrációjú morfin és feleslegben alkalmazott UDP-glukuronsav jelenlétében 5 perc alatt keletkezett M3G mennyiségéből számoltuk a glukuronidáció sebességét. Amennyiben a mikroszómamembránt alameticin segítségével szabadon átjárhatóvá tettük, a reakció sebessége tízszeresére nőtt (1. táblázat). Más szavakkal, intakt mikroszómán mindössze 10%-át mértük a permeabilizált mikroszómán kapott értéknek. Az enzimaktivitás ugyanakkor mindkét esetben a morfin koncentrációjával párhuzamosan nőtt. Összességében tehát az UGT enzim latenciája, az alkalmazott morfinkoncentrációtól függetlenül, 90%-nak bizonyult.

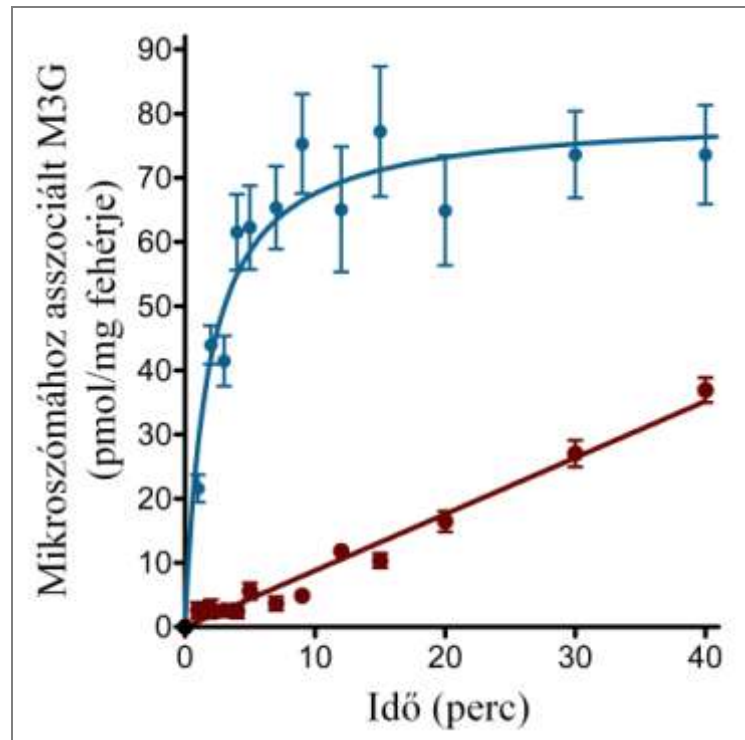
morfin-koncentráció	UGT aktivitás intakt mikroszóma (pmol/perc/mg fehérje)	UGT aktivitás permeabilizált mikroszóma (pmol/perc/mg fehérje)	latencia (%)
50 μM	20,53 \pm 3,71	233,36 \pm 55,26	91,20
100 μM	44,85 \pm 4,08	458,80 \pm 61,97	90,23
200 μM	62,02 \pm 12,19	809,07 \pm 26,72	92,33

1. táblázat: A morfinglukuronidáció sebessége intakt és permeabilizált mikroszómában

Intakt és permeabilizált mikroszómát (1 mg/ml) inkubáltunk morfin (a táblázatban olvasható koncentrációkban) és feleslegben (2 mM) adott UDP-glukuronsav jelenlétében. A morfinglukuronidáció sebességét az 5 perc alatt keletkező M3G mennyiségéből számoltuk. (három mérésből számolt átlag \pm szórás) Az enzimaktivitás latenciáját (a permeabilizált és az intakt mikroszómán mért aktivitáskülönbség, az előbbi érték százalékában kifejezve) szintén feltüntettük.

8.1.4. Az újonnan keletkezett M3G akkumulációja intakt mikroszómában

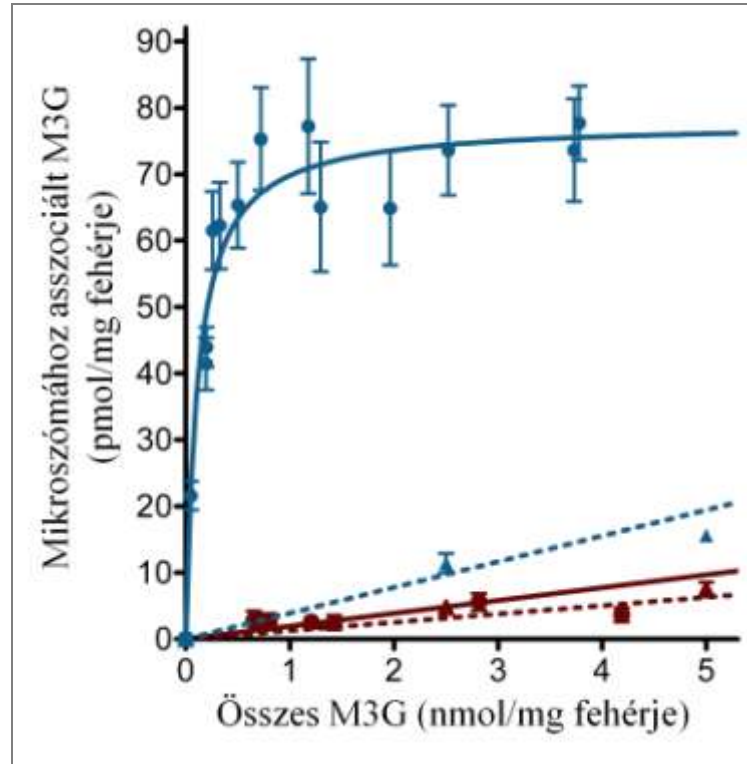
A továbbiakban 100 μM morfin *in situ* glukuronidációja során mértük a keletkező M3G teljes mennyiségét, valamint az intakt és a permeabilizált vezikulumokhoz asszociált M3G mennyiségét külön is meghatároztuk. A mikroszómát – ismét feleslegben alkalmazott UDP-glukuronsav jelenlétében – ezúttal 100 μM morfin jelenlétében inkubáltuk, majd különböző időpillanatokban mintát vettünk, melyből gyorszűrés és mosás után meghatároztuk a mikroszómához asszociált M3G mennyiségét. Permeabilizált mikroszómán végezve a kísérletet magához a membránhoz tapadó glukuronid mennyiségét mértük, mely az idővel (tulajdonképpen a glukuronidkoncentrációval) lineárisan növekedett (9. ábra).



9. ábra: A vezikulumok M3G-tartalmának alakulása *in situ* glukuronidáció esetén

Intakt (kék) és permeabilizált (bordó) mikroszómát (1 mg/ml) 2 mM UDP-glukuronsav és 100 μM morfin jelenlétében inkubáltunk. A termelt M3G teljes mennyisége az ábrán nincs feltüntetve. A vezikulumok M3G-tartalmát gyorszűrés után LC-MS segítségével határoztuk meg a feltüntetett időpontokban.

(három mérésből számolt átlag \pm szórás)



10. ábra: A luminálisan keletkező M3G akkumulációja intakt mikroszómában

Intakt (kék) és permeabilizált (bordó) mikroszómát (1 mg/ml) kétféleképpen kezeltünk: egyrészt 2 mM UDP-glukuronsav és 100 μ M morfin jelenlétében inkubáltuk (folytonos vonal), és az *in situ* keletkező M3G-mennyiséget határoztuk meg. Másrészt a mikroszómát 100 percig inkubáltuk különböző koncentrációjú M3G-vel, ezzel egyensúlyi helyzetet hoztunk létre az extra- és intraluminális tér között (szaggatott vonal). Mindkét esetben gyorsszűrés után LC-MS segítségével mértük a (keletkező vagy hozzáadott) M3G vezikulumokhoz asszociált mennyiségét. A kapott értékeket a minta teljes glukuronidmennyiségének függvényében ábrázoltuk.

(három mérésből számolt átlag \pm szórás)

A permeabilizált mikroszóma M3G-tartalmát a minta teljes glukuronidmennyiségének függvényében is ábrázoltuk (10. ábra). Az így kapott lineáris függvényt összevetettük korábbi eredményeinkkel, mikor M3G jelenlétében 100 percig inkubálva a mikroszómát egyensúlyi helyzetben vizsgáltuk a vezikulumokhoz asszociált és a minta teljes glukuronidmennyisége közötti összefüggést (6. ábra). A két függvény összehasonlításakor azt tapasztaljuk, hogy a glukuronidok membránhoz kötődésében nincs érdemleges különbség abban az esetben, ha a glukuronidot kívülről adjuk a

mikroszómához vagy ha az M3G *in situ* termelődik (10. ábra). Ez a megállapítás összhangban áll azzal a feltételezéssel, hogy az újonnan keletkezett M3G a pórusképző alamicinnel „kilyuggatott” mikroszómamembránon keresztül akadály nélkül lép ki a lumenből.

Ettől lényegesen eltérő eredményeket kaptunk intakt mikroszómán, ahol az M3G luminális felhalmozódásának egyértelmű jelei mutatkoztak. Annak ellenére, hogy intakt mikroszómában a glukuronidáció sebessége csak tizede a permeabilizált mikroszómában mért aktivitásnak, a vezikulumok M3G-tartalma rövid inkubációs idők mellett mégis jelentősen, mintegy 30-szor gyorsabban nő, amennyiben a mikroszóma membránja ép (9. ábra). Az M3G mennyiségének kezdeti, gyors növekedése 8-10 perc után megáll, elér egy plató szakaszt, az M3G magas szintje inntől a kísérlet végéig (40 perc) változatlanul fennmarad. A teljes M3G-mennyiség függvényében ábrázolva a vezikulumok glukuronidtartalmát (10. ábra), és az eredményeket ebben az esetben is a korábbi, egyensúlyi helyzetben mért adatokkal (6. ábra) összevetve, látjuk, hogy intakt mikroszómában *in situ* glukuronidáció esetén az egyensúlyi helyzetnél jóval magasabb intraluminális M3G-koncentráció alakul ki.

8.2. A zöld tea flavanolak glukuronidtranszportra kifejtett hatásának vizsgálata

Munkánk második részében megvizsgáltuk, milyen hatást gyakorolnak a zöld tea flavanolak a deglukuronidációra és a glukuronidtranszportra. Sejtenyészetben és mikroszómán mértük a mikroszomális β -glukuronidáz aktivitását és latenciáját a fontosabb katekinok jelenlétében és hiányában. Ezt követően transzportméréseket végeztünk, és meghatároztuk az EGCG glukuronidtranszportra gyakorolt hatásának idő- és koncentrációfüggését. Ezekhez a kísérletekhez modell szubsztrátként a könnyen detektálható MUGA-t használtuk.

8.2.1. A β -glukuronidáz aktivitásának és latenciájának mérése

Különböző (1 μ M és 1 mM közötti) MUGA-koncentrációk mellett mértük a glukuronid hidrolízisének sebességét intakt és permeabilizált mikroszómán (11. ábra). Amennyiben a membránt alamicinnel permeabilizáltuk, és így az enzim szabadon

hozzáfért szubsztrátjához, a Michaelis-Menten kinetikát mutató glukuronidáz aktivitás kinetikai paraméterei a következőképpen alakultak: a Michaelis-konstans (K_m) értéke $279,7 \pm 12,6 \mu\text{M}$ -nak, a maximális enzimaktivitás (v_{max}) pedig $1,99 \pm 0,04 \text{ nmol/perc/mg}$ fehérjének bizonyult (3. táblázat). Intakt mikroszómamembrán esetén ezzel szemben jelentősen alacsonyabb enzimaktivitást tudtunk detektálni, a különbség az alkalmazott koncentrációtartományban közel 40%-a ($50 \mu\text{M}$ MUGA mellett 36,5%-a) volt a permeabilizált mikroszómán mért aktivitásnak.

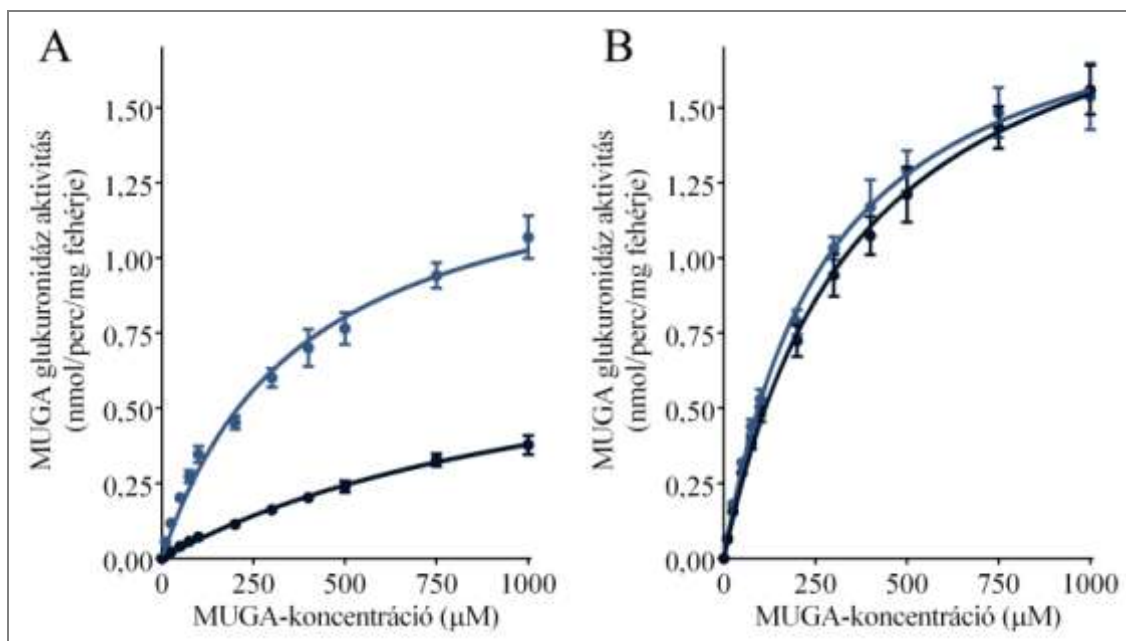
Sejttenyészetten (Hepa 1c1c7 egér hepatoma sejtek) tovább vizsgáltuk a fenti, latenciának nevezett jelenséget (13. ábra). Alameticin segítségével mind a sejthártyán, mind az ER membránján pórusokat létrehozva a fentiekkel összhangban az enzimaktivitás jelentős növekedését láttuk. Érintetlenül hagyott membrán esetén a MUGA-hidrolízis sebessége csak mintegy 55%-át tette ki a permeabilizált sejteken mért aktivitásnak. A latencia értéke sejtes rendszerben tehát még a mikroszómán mért 40%-os értéknél is valamelyest nagyobbak, 45%-nak bizonyult.

	intakt mikroszóma (pmol/perc/mg fehérje)	permeabilizált mikroszóma (pmol/perc/mg fehérje)	latencia (%)
kontroll	$202,5 \pm 18,2$	$318,9 \pm 11,4$	36,5
EC	$191,5 \pm 10,7$	$315,9 \pm 8,3$	39,4
ECG	$67,6 \pm 5,7$ *	$312,0 \pm 10,6$	78,3
EGC	$161,6 \pm 12,9$ *	$323,5 \pm 7,6$	50,0
EGCG	$40,4 \pm 5,0$ *	$284,3 \pm 9,3$	85,8
GC	$130,9 \pm 9,7$ *	$306,6 \pm 11,5$	57,3
GCG	$35,7 \pm 2,8$ *	$194,6 \pm 19,9$ *	81,6

2. táblázat: Zöld tea flavanolak hatása a mikroszomális β -glukuronidázra

Intakt és alameticinnel permeabilizált patkány máj mikroszómában ($0,5 \text{ mg/ml}$) mértük a β -glukuronidáz aktivitását $50 \mu\text{M}$ MUGA szubsztrát mellett, $200 \mu\text{M}$ flavanol jelenlétében vagy hiányában (kontroll mérés). A latencia mutatja a permeabilizált és az intakt mikroszómán mért aktivitások különbségét, az előbbi érték százalékában kifejezve. (három mérésből számolt átlag \pm szórás)

* szignifikáns különbség ($p < 0,01$) a kontrollhoz képest



11. ábra: Patkány máj mikroszóma glukuronidáz (MUGA-hidroláz) aktivitása

Különböző koncentrációban (0 és 1000 μM között) adott MUGA mellett határoztuk meg intakt (A) és permeabilizált (B) mikroszóma (0,5 mg/ml) glukuronidáz aktivitását 200 μM EGCG jelenlétében (sötétkék) vagy hiányában (kontroll mérés, világoskék). A 10 perc alatt keletkező MUMB mennyiségét HPLC segítségével mértük meg. A reakció kezdeti sebességét az 1 perc alatt 1 mg fehérje által termelt MUMB mennyiségeként adtuk meg. (három mérésből számolt átlag \pm szórás)

8.2.2. A zöld tea flavanolak hatása a β -glukuronidáz aktivitására mikroszómában és hepatoma sejtekben

Különböző zöld tea polifenolok deglukuronidációra gyakorolt hatását vizsgáltuk intakt és alameticinnel kezelt mikroszómán, 50 μM MUGA koncentrációt alkalmazva (2. táblázat). Permeabilizált mikroszómán a tanulmányozott flavanolak a GCG kivételével nem fejtettek ki hatást a hidrolízis sebességére, ami azt jelenti, hogy a β -glukuronidáz enzimet közvetlenül csak a GCG gátolta az alkalmazott 200 μM -os koncentrációban. Ezzel szemben, az EC kivételével, mindegyik polifenol szignifikánsan lassította a MUGA hidrolízisét ép mikroszómamembrán esetén. Legerősebb gátlást (70-80%) a GCG és az EGCG esetében figyelhettünk meg. Valamivel gyengébb gátló hatást gyakorolt a

deglukuronidációra az ECG; a legkevésbé effektív, de még mindig szignifikáns hatást kifejtő polifenolok pedig az EGC és a GC voltak. Az intakt és a permeabilizált mikroszómán mért aktivitások disszociációja a latencia növekedését vonja maga után, mely például az EGCG esetében a korábban megfigyelt 40% körüli értékről 80% feletti értékre emelkedett. A flavanol jelenlétében tehát a glukuronid membránon keresztüli transzportja sokkal nagyobb mértékben korlátozza a lumenális enzim aktivitását.

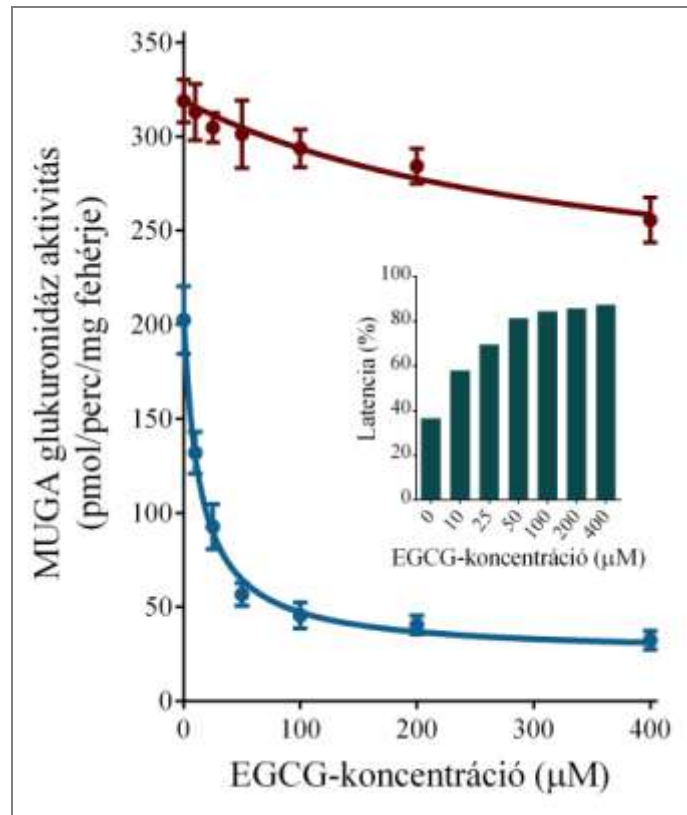
	intakt mikroszóma	permeabilizált mikroszóma
v_{max} (nmol/perc/mg fehérje)		
kontroll	1,42 ± 0,08	1,99 ± 0,04
EGCG	0,85 ± 0,05	2,10 ± 0,05
K_m (μM)		
kontroll	380,6 ± 47,6	279,7 ± 12,6
EGCG	1243,0 ± 120,2	361,4 ± 18,0

3. táblázat: A glukuronidáz kinetikai paramétereinek változása EGCG hatására

A glukuronidáz aktivitást intakt és permeabilizált mikroszómán (0,5 mg/ml) mértük különböző koncentrációban (0 és 1000 μM között) alkalmazott MUGA szubsztrát mellett 200 μM EGCG jelenlétében vagy hiányában (kontroll mérés). A kinetikai paramétereiket a 11. ábrán bemutatott eredmények alapján, GraphPad Prism® szoftver segítségével számoltuk. (három mérésből számolt átlag ± szórás)

A glukuronidáz aktivitás kinetikai paramétereinek változását a latencia emelkedése szempontjából leghatásosabb, egyben a zöldteában előforduló, mennyiségileg legjelentősebb polifenol, az EGCG esetében vizsgáltuk. A korábbi eredményekkel összhangban a permeabilizált mikroszómán felvett telítési görbe EGCG jelenlétében csupán minimális eltérést mutatott a kontrollhoz képest (11/B ábra), így az enzimaktivitás valós kinetikai paramétereiben a K_m enyhe növekedésén kívül egyéb változás nem következett be. Amennyiben azonban a vezikulumok membránját előzőleg nem tettük szabadon átjárhatóvá, az EGCG nagymértékben fékezte a glukuronidok hidrolízisét (11/A ábra). Az aktivitás látszólagos (az intakt mikroszómán mért aktivitásokból kiszámítható)

kinetikai jellemzőiben tehát számottevő változás jelentkezett, a v_{\max} közel a felére csökkent, míg a K_m értéke több mint háromszorosára nőtt (3. táblázat).



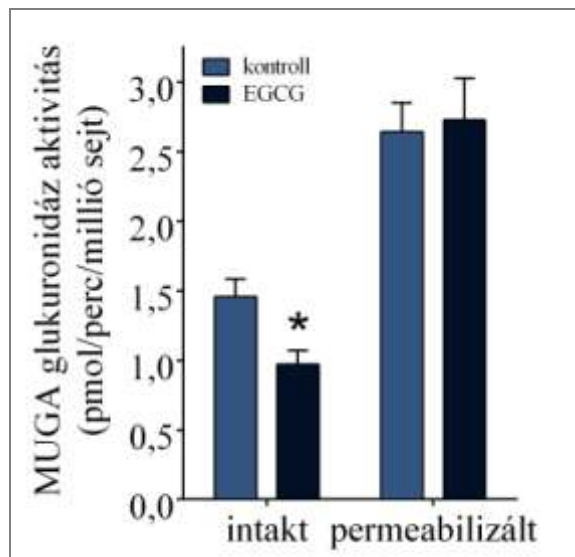
12. ábra: Az EGCG glukuronidázra gyakorolt gátló hatásának koncentrációfüggése

A glukuronidáz aktivitását 50 µM MUGA szubsztrát mellett, intakt (kék) és permeabilizált (bordó) patkány máj mikroszómában (0,5 mg/ml) mértük. Az EGCG-t 1 perccel a szubsztrát hozzáadása előtt alkalmaztuk a feltüntetett koncentrációkban (0 µM és 400 µM között). A permeabilizált és az intakt mikroszómán mért aktivitások különbségéből számolt latenciát is az EGCG-koncentráció függvényében ábrázoltuk.

(három mérésből számolt átlag ± szórás)

Funkcionális vizsgálatainkat az EGCG hatásának koncentrációfüggésével folytattuk (12. ábra). Permeabilizált mikroszómán 10 µM és 400 µM közötti koncentrációtartományban ezúttal sem tapasztaltunk figyelemre méltó gátló hatást: 50 µM EGCG jelenlétében például az aktivitás mindössze 6%-kal mérséklődött ($301,3 \pm 18,0$ pmol/perc/mg fehérje a kontroll $318,9 \pm 11,4$ pmol/perc/mg fehérje értékhez képest; átlag ± szórás; $p > 0,05$; $n=3$). Ezzel ellentétben már alacsony flavanolkoncentráció mellett is

jelentősen csökkent a deglukuronidáció sebessége intakt mikroszómában: 50 μM EGCG esetén 70%-nál is nagyobb volt a gátlás mértéke ($56,6 \pm 6,1$ pmol/perc/mg fehérje a kontroll $202,5 \pm 18,2$ pmol/perc/mg fehérje értékhez képest; átlag \pm szórás; $p < 0,01$; $n=3$). Intakt mikroszómán az EGCG koncentrációjának emelésével az enzimaktivitás 90%-os csökkenését tudtuk elérni. A mért adatokból számolt IC_{50} és K_i értékek rendre 14,5 μM -nak és 12,8 μM -nak adódtak. Az EGCG emelkedő koncentrációinak hatására a glukuronidáz latenciájának egyre nagyobb mérvű emelkedését figyelhettük meg: a kontrollban észlelt 40%-os latencia már 50 μM EGCG jelenlétében is 80%-ra, magasabb EGCG koncentráció esetén 90% fölé emelkedett. Ez utóbbi esetben tehát a mikroszóma integráns membránján keresztüli transzport az enzimaktivitást a membránpermeabilizálás után elérhető érték 10%-ára korlátozta.



13. ábra: EGCG hatása egér hepatoma sejtek glukuronidáz aktivitására

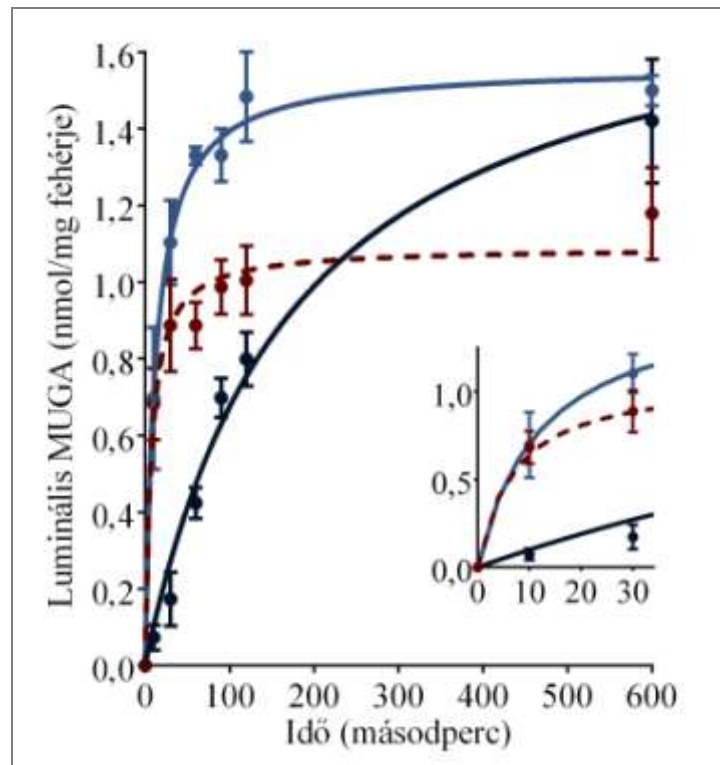
Intakt és alameticinnel kezelt egér Hepa 1c1c7 hepatoma sejtek ($5 \cdot 10^6$ sejt/ml) glukuronidáz aktivitását 200 μM MUGA szubsztrátot alkalmazva mértük 100 μM EGCG jelenlétében (sötétkék) vagy annak hiányában (kontroll mérés, világoskék). A keletkező MUMB mennyiségét HPLC segítségével határoztuk meg. A reakció sebességét az 1 perc alatt 10^6 sejt által előállított termék mennyiségeként adtuk meg.

(három mérésből számolt átlag \pm szórás)

** szignifikáns különbség ($p < 0,01$) a kontrollhoz képest*

Az EGCG hatását Hepa 1c1c7 eger hepatoma sejteken is megvizsgáltuk. A mikroszómán végzett kísérletekkel egyezően a flavanol nem fejtett ki hatást az alameticinnel kezelt sejtekben zajló deglukuronidációra, míg ép membránokkal rendelkező sejteken jelentős mértékű gátlást mértünk (13. ábra).

A sejtes rendszerben végzett kísérletek során az EGCG szulfatáció és glukuronidáció segítségével konjugálódhat. Ennek kizárására HPLC-vel meghatároztuk a minták EGCG-tartalmát is. Azt tapasztaltuk, hogy az EGCG mennyisége az inkubáció ideje alatt nem csökkent szignifikáns mértékben.



14. ábra: A MUGA felvételének időfüggése patkány máj mikroszómában

Szacharolaktonnal (10 mM) kezelt mikroszómához (2 mg/ml) 2 mM MUGA-t adtunk 200 μ M EGCG jelenlétében (sötétkék) vagy hiányában (kontroll mérés, világoskék). A feltüntetett időpontokban a vezikulumok glukuronidtartalmát gyorsszűrés után HPLC segítségével határoztuk meg. A MUGA mennyiségét mind intakt, mind permeabilizált mikroszómán megmértük, a kettő különbsége adta a luminális glukuronidmennyiséget. A kontroll mérést szacharolakton hozzáadása nélkül is elvégeztük (bordó, szaggatott vonal). A MUGA-felvétel kezdeti 30 másodperce kinagyítva is látható.

(három mérésből számolt átlag \pm szórás)

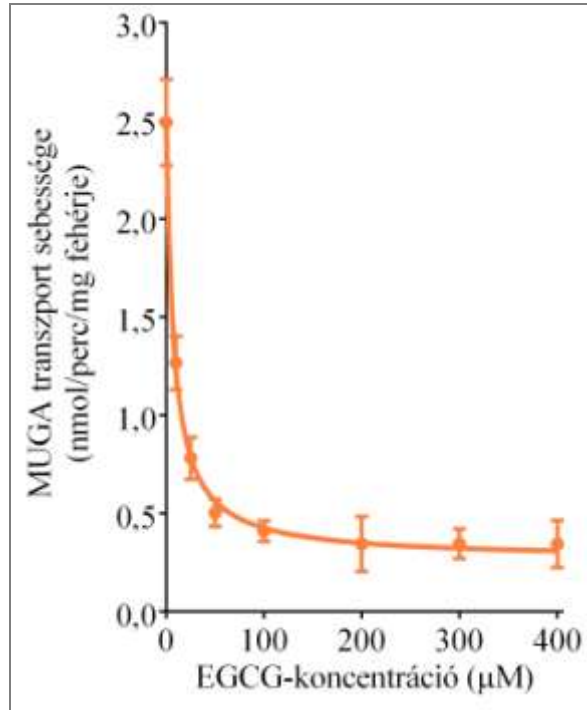
8.2.3. Az EGCG hatása a mikroszomális glukuronidtranszportra

Az enzimaktivitás-mérések eredményei arra engednek következtetni, hogy a MUGA hidrolízisét a flavanokok nem az enzim közvetlen gátlásán keresztül fékezik, hanem a szubsztrát ER membránján keresztüli átjutását lassítják, így az enzim szubsztrátellátottságát rontják. Feltételezésünket a glukuronidtranszport közvetlen mérésével támasztottuk alá. Gyorsszűrés (rapid filtráció) segítségével nyomon követtük a MUGA felvételét a mikroszómába. Intakt és permeabilizált vezikulumokon végzett párhuzamos mérések segítségével, a két eredmény különbségeként határoztuk meg a lumenben elhelyezkedő MUGA mennyiségét.

A kísérlet során a lumen glukuronidtartalma gyorsan nőtt, 2 perc alatt elérte az egyensúlyi állapotot, mely ezután legalább 10 percen keresztül változatlanul fennmaradt (14. ábra). A glukuronidgátló szacharolakton jelenléte – a várakozásnak megfelelően – megemelte a lumenben glukuronid egyensúlyi koncentrációját, ugyanakkor a transzport kezdeti sebességét nem befolyásolta, és így a transzportméréseink eredményeit sem torzította.

200 μM EGCG hozzáadása a (szacharolaktonnal kezelt) vezikulumokhoz nagymértékben lassította a MUGA felvételét, az egyensúlyi helyzetet azonban nem befolyásolta. A vezikulumok 2 perc alatt csupán feleannyi glukuronidot vettek fel, mint EGCG hiányában, 10 perc után azonban már nem volt szignifikáns különbség a lumenben MUGA mennyiségében a flavanokkal kezelt és a kontroll mikroszómák között. A transzport kezdeti sebessége 86%-kal csökkent EGCG jelenlétében ($0,35 \pm 0,14$ nmol/perc/mg fehérje a kontroll $2,49 \pm 0,22$ nmol/perc/mg fehérje értékhez képest; átlag \pm szórás; $P < 0,01$; $n=3$).

A gátlás kinetikájának vizsgálatához a transzportméréseket az EGCG különböző koncentrációi mellett is elvégeztük. Az aktivitásmérések során tapasztaltakkal megegyezően koncentrációfüggő gátlást láttunk (15. ábra), a két dózis-hatás görbe erős hasonlóságot mutatott. 50 μM EGCG a glukuronidfelvétel sebességében 80%-os csökkenést okozott ($0,5 \pm 0,07$ nmol/perc/mg fehérje a kontroll $2,49 \pm 0,22$ nmol/perc/mg fehérje értékhez képest; átlag \pm szórás; $P < 0,01$; $n=3$), ennél magasabb EGCG-koncentrációkat alkalmazva közel 90%-os gátlást is el tudtunk érni. Azt IC_{50} számított értéke 7,9 μM -nak bizonyult.



15. ábra: Az EGCG glukuronidtranszportra gyakorolt hatásának koncentrációfüggése

Különböző koncentrációjú (0-400 µM) EGCG jelenlétében követtük nyomon a MUGA (2 mM) felvételét szacharolaktonnal (10 mM) előkezelt patkány máj mikroszómába. A flavanolt egy perccel a szubsztrát hozzáadása előtt adtuk a mikroszómához. Gyorsszűrés és mosás után HPLC-vel mértük meg a minta MUGA-tartalmát. A luminális glukuronid mennyiségét az intakt és a permeabilizált mikroszómán mért eredmények különbsége adta. (három mérésből számolt átlag ± szórás)

9. Megbeszélés

Az ER-ben zajló biokémiai folyamatok modulálásában jelentős szerepet játszanak az organelum membránjának transzport folyamatai. A reakciókat katalizáló lúminális enzimek szubsztrátjaikat a citoplazmából kapják, a termékeik pedig oda lépnek ki. Az ER membránja barrierként működik, a lúminális enzimek szubsztrátellátottságát, a termékek eliminációját a membránon keresztül folyó transzport sebessége és szelektivitása határozza meg. A foszfolipid kettősréteg a nagyméretű poláros, esetleg töltéssel rendelkező molekulák számára átjárhatatlan, ezek a vegyületek a biológiai membránokon csak megfelelő transzporter fehérje közreműködésével juthatnak át. Kísérletes körülmények között intakt mikroszómamembrán esetén – mikor a lúminális enzim működését a szubsztrát membránon keresztüli átjutása korlátozza – gyakran alacsonyabb aktivitást mérünk, mint a membrán permeabilizálása, átjárhatóvá tétele után. A latenciának nevezett jelenség azt mutatja, hogy a transzport az adott biokémiai folyamat sebességmeghatározó lépése. Ebben az esetben csak permeabilizált mikroszómában mérjük az enzim maximális aktivitását és a valós kinetikai paramétereket, míg intakt mikroszómában nem érjük el a maximális sebességet, és csupán látszólagos kinetikai jellemzőket mérünk. Az ER lokalizációjú enzimek leg többjéről, így az általunk vizsgált UGT-kről és a β -glukuronidázról is, leírták korábban, hogy latens aktivitásúak. Fenti méréseink során, az irodalmi adatokkal összehangban [34], 90%-os latenciát észleltünk a morfin UGT esetében (1. táblázat). A β -glukuronidáz latenciája MUGA szubsztrát mellett mikroszómában 36,5%-nak bizonyult (2. táblázat). Hasonló eredményt írtak le korábban, mikor más modell vegyületek, a 4-nitrofenil-glukuronid és a fenolftalein-glukuronid segítségével vizsgálták a β -glukuronidáz aktivitását [51]. A MUGA deglukuronidációját egér hepatoma sejteken vizsgálva valamelyest nagyobb latenciát detektáltunk (45%), mint mikroszómában, mely arra utal, hogy sejtes rendszerben nem csak az ER membrán, hanem a sejthártya is lassítja a glukuronidok eljutását az enzimhez.

A sejtek tartalmaznak lizoszomális β -glukuronidázt is: ez az enzim fiziológias körülmények között az exo- és endocitózis során a lizoszómákba zárt proteoglikánok és glikolipidek lebontását katalizálja. Működéséhez savas pH szükséges, melyet a lizoszomális membrán elroncsolása vagy átjárhatóvá tétele megszüntet, így permeabilizált sejtekben az enzim inaktív. Ugyanakkor nem zárható ki, hogy az intakt sejteken végzett

mérések során a glukuronidáz aktivitás egy részét a lizoszomális enzim működésének köszönhetjük. Mindezt figyelembe véve, elképzelhető, hogy sejtes rendszerben a mikroszomális β -glukuronidáz valódi latenciája a mért 45%-nál is magasabb.

A latencia fent részletezett jelensége egyrészt igazolja a vizsgált enzimek aktív centrumának intraluminális elhelyezkedését, másrészt felhívja a figyelmet a transzport folyamatok jelentőségére.

A glukuronsavas konjugáció szubsztrátjai, a rendszerint zsíroidékony aglikonok feltehetően egyszerű diffúzió segítségével átjutnak az ER membránján. Ezzel szemben a glukuronsav disszociált karboxilcsoportja és hidroxilcsoportjai hidofil, töltéssel rendelkező és poláros karaktert kölcsönöznek az UDP-glukuronsavnak és a glukuronidoknak, vagyis ezek transzportja szükségképpen csak fehérjemediált folyamatként valósulhat meg [22]. Ennek megfelelően általában az UDP-glukuronsav transzportját tartjuk a glukuronidáció sebességmeghatározó lépésének, és ezt tesszük felelőssé az UGT aktivitás latenciájáért [35]. Ugyanakkor fontos észrevennünk, hogy intakt mikroszómában a glukuronsavas konjugáció sebessége a különböző szubsztrátok esetén igen eltérő, annak ellenére, hogy az összes UGT izoenzim UDP-glukuronsavat használ kofaktorként. Így az UGT enzimek latenciáját nem magyarázza teljes mértékben az UDP-glukuronsav lassú mikroszomális felvétele. Feltételezhető, hogy a nagyméretű glukuronidok esetében az ER-ből történő lassú kiáramlás – a glukuronid luminális akkumulációja révén – szintén befolyásolja a konjugáció sebességét.

Míg a glukuronidtranszport sebessége az UGT-k aktivitását csak bizonyos szubsztrátok esetében, és csak részben korlátozza, egyértelműen sebességmeghatározó szereppel bír az ellenkező irányú folyamatban, a már konjugált vegyületek hidrolízisekor, amit a mikroszomális β -glukuronidáz latenciája bizonyít. A glukuronidtranszport gátlása tehát elsősorban a deglukuronidációt befolyásolhatja, míg a legtöbb aglikon glukuronsavas konjugációját feltehetőleg nem akadályozza.

Az ER transzportfolyamatainak jelentős szerepe ellenére a közreműködő fehérjék többségének azonosítása mindeddig sikertelen volt. A terület lassú fejlődése minden bizonnyal a technikai nehézségeknek tulajdonítható: a kis luminális térfogat és az ER membránjának igen magas fehérjetartalma miatt a transzportfehérjék vizsgálatának klasszikus módszerei kudarcot vallanak. Nem meglepő tehát, hogy a

metabolittranszporterek közül sikeresen azonosított glukóz-6-foszfát-transzlokázt sem biokémiai, hanem molekuláris biológiai (génalapú) módszerrel identifikálták [105].

Hasonlóan az ER transzportereinek többségéhez, a glukuronidok felvételét és leadását végző fehérjé(ke)t sem ismerjük molekuláris szinten. A fehérje funkcionális vizsgálatáról is csak néhány közlemény olvasható az irodalomban. Az értekezésemben bemutatott saját vizsgálataink a glukuronidtranszport néhány eddig nem ismert sajátosságát tárták fel.

Korábbi eredmények szerint az ösztadiol-17 β -D-glukuronid mikroszomális felvétele és leadása fehérjemediált, kétirányú, telíthető, idő- és hőmérsékletfüggő, passzív transzport folyamat. Míg a plazmamembránon keresztül a glukuronidok aktív transzport segítségével jutnak át – ezt a folyamatot a jól ismert ABC-transzporterek és az OATP családba tartozó fehérjék katalizálják ATP vagy redukált glutation felhasználásával –, addig a glukuronidok mikroszomális felvételét sem ATP, sem glutation hozzáadása nem befolyásolja. Ez a folyamat, az UDP-glukuronsav felvételhez hasonlóan, az általános aniontranszport-gátló szerekkel (DIDS, probenid) lassíthatónak bizonyult, a transzport specifikus gátlószereit azonban eddig nem írták le [25].

Kísérleteink során a zöld tea flavanoloikról kimutattuk, hogy a glukuronidtranszport hatékony gátlószerei. Az EGCG, a zöld tea legjelentősebb polifenolja, natív mikroszómában koncentrációfüggő módon gátolta mind a mikroszomális β -glukuronidáz működését (12. ábra), mind a glukuronidtranszportot (15. ábra).

Enzimaktivitás-mérések segítségével azt tapasztaltuk, hogy a zöld tea polifenoljai intakt mikroszómamembrán esetén a MUGA hidrolízisét jelentősen fékeztek, nem fejtettek ki azonban hatást permeabilizált membrán mellett (2. táblázat, 11. ábra). Más megfogalmazásban a vizsgált katekinok hatására az intakt és a permeabilizált mikroszómában mért aktivitások disszociációját láttuk: a leghatékonyabbnak bizonyuló EGCG és GCG a β -glukuronidáz latenciáját 80% fölé emelte. A mikroszómán végzett mérésekhez hasonlóan az EGCG ép membránnal rendelkező egér hepatoma sejteken is csökkentette a MUGA deglukuronidációját, míg ebben az esetben sem fejtett ki gátló hatást a membrán permeabilizálása után (13. ábra).

Az intakt sejteken végzett mérések esetében nem zárható ki, hogy a MUGA dekonjugációjához a lizoszomális glukuronidáz működése is hozzájárul. Ennek a folyamatnak a jelentőségét megítélni nem tudjuk, tekintettel arra, hogy sem a lizoszomális

membrán glukuronidtranszportját, sem a lizoszomális glukuronidáz latenciáját nem vizsgálták eddig. Mindemellett a mikroszómán és a hepatoma sejteken megfigyelt hasonló gátlást kétféleképpen magyarázhatjuk. Egyik lehetséges magyarázat az, hogy a lizoszomális hidrolízis elhanyagolható mértékű az ER lumenében zajló deglukuronidációhoz képest. Elképzelhető ugyanakkor az is, hogy az EGCG a lizoszomális és a mikroszomális aktivitást egyforma mértékben fékezi.

Az EGCG hatástalansága olyan kísérleti körülmények között, mikor az enzim szabadon hozzáfér szubsztrátjához, azt mutatja, hogy a katekin a β -glukuronidáz enzimet közvetlenül nem gátolja. A latencia növekedése arra utal, hogy EGCG jelenlétében a glukuronid nehezebben jut el a lumenbe elhelyezkedő enzimhez, vagyis a katekin az ER glukuronidtranszportját fékezi. Ezt a feltételezést közvetlen transzportvizsgálataink is alátámasztották. Gyorsszűrés segítségével mértük a mikroszóma MUGA-felvételének sebességét kontroll mintákon (EGCG hozzáadása nélkül) és EGCG jelenlétében. A katekin a transzport kezdeti sebességét jelentősen csökkentette: már 50 μ M-os koncentrációban 80% feletti gátlást figyelhettünk meg; nagyobb koncentrációknál a gátlás a 90%-ot is megközelítette (15. ábra). A mikroszomális glukuronidfelvétel vizsgálata során EGCG hiányában 2 perc alatt, míg EGCG jelenlétében csak 10 perc alatt állt be az egyensúlyi állapot (14. ábra). Kiemelendő, hogy a flavanol jelenléte nem változtatta meg az egyensúlyi glukuronidkoncentrációt; ezzel kizárhatjuk, hogy az ozmotikus viszonyok és a vezikulumok méretének a megváltozása okozná a transzport látszólagos csökkenését. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a zöld tea katekinek a deglukuronidációt közvetve, a glukuronidtranszport gátlásán keresztül fékezik.

Egyelőre kevés vizsgálat született arra vonatkozóan, hogy az EGCG hogyan befolyásolja az ER többi transzporterének működését. A rendelkezésre álló adatok alapján mégis úgy látszik, hogy az EGCG jelentősen specifikusabb hatást fejt ki, mint az eddig ismert gátlószerek, az általános aniontranszport-gátló és tiol-alkiláló vegyületek. A flavanol ugyanis nem befolyásolja sem a glukozidok (például a MUGA-hoz hasonló szerkezetű metil-umbelliferil-glukozid) [86], sem a glukóz-6-foszfát mikroszomális felvételét [96]. Ugyanakkor az ER glukóztranszportját – bár jelentősen kisebb mértékben – ugyancsak lassítja [96]. A glukuronidtranszportot gátló katekinek szerkezetét tanulmányozva megállapíthatjuk, hogy a gallo- és a galláts csoport jelenléte a hatékonyságot fokozta (2. táblázat). Legjelentősebb gátlást azon vegyületek esetében figyelhettünk meg,

melyek mindkét funkciós csoportot tartalmazzák: az EGCG és a GCG esetében. Gallo csoport hiányában a vegyület (ECG) kevésbé hatékony, és még enyhébb gátlást láttunk, amennyiben a katekin gallo csoportot ugyan hordoz, gallátcsoportot azonban nem (GC és EGC). Az EC, mely egyik funkciós csoporttal sem rendelkezik, kísérleteink során hatástalannak bizonyult.

A katekinek a későbbiekben hasznos segítséget nyújthatnak a mindaddig azonosítatlan transzport fehérje/fehérjék további vizsgálatában.

Korábbi eredmények alapján valószínűnek látszik, hogy a glukuronidok transzportját nem egyetlen fehérje végzi, hanem a mikroszomális membrán több különböző, eltérő specificitású glukuronid-transzporterrel rendelkezik. Megfigyelték ugyanis, hogy az ösztradiol-17 β -D-glukuronid felvételét több glukuronid (ösztradiol-3 β -D-glukuronid és a fenolftalein- β -D-glukuronid) gátolta, míg más glukuronidok (p-nitrofenil- β -D-glukuronid és a p-acetamidofenil- β -D-glukuronid) nem befolyásolták a transzport sebességét, annak ellenére, hogy maguk is felvételre kerülnek a mikroszómába [25]. A jelenség további vizsgálata a különböző glukuronidok közötti kompetíciók feltérképezésével legalább három különböző transzporterfehérje létezését valószínűsíti; a transzporterek specificitását a glukuronidok mérete és alakja határozza meg [52].

Annak ellenére, hogy nem ismert olyan kórkép, melynek hátterében bizonyítottan a glukuronidtranszport defektusa állna, az elváltozást egy konjugált hiperbilirubinémiában szenvedő beteg esetében kimutatták. A bilirubin- β -D-diglukuronid felhalmozódott a beteg májából készült mikroszómában, érdekes módon azonban a kisméretű 1-naftil- β -D-glukuronid normális sebességgel lépett ki a lumenből [52]. A különböző méretű glukuronidok transzportja között e humán patológiás esetben is megfigyelt különbség ismételtelen alátámasztja a mérettől/alaktól függő eltérő specificitású glukuronid-transzporterek létezését. A kicsi és nagy glukuronidok elkülönült transzportja felveti annak a lehetőségét is, hogy a transzportért felelős fehérje a konjugált vegyületek további útjának meghatározásában is szerepet játszik. Ismert jelenség ugyanis, hogy a terjedelmes glukuronidok rendszerint a hepatociták apikális (kanalikuláris) membránján keresztül, míg a kisebb méretűek jellemzően a bazolaterális membránon keresztül hagyják el a sejtet [54]. Kérdéses azonban, hogy a sejt melyik részén kezdődik a glukuronidok szortírozása.

A különböző glukuronidok transzportjának sebessége széles határok között változik. Általánosságban elmondható, hogy a kisméretű glukuronidok gyorsabban, a

nagyobbak lassabban lépik át az ER membránját. A legkisebb vizsgált glukuronid, a p-nitrofenil- β -D-glukuronid olyan gyorsan hagyja el a patkány máj mikroszómát, hogy gyors szűréssel nem is volt lehetséges a transzport sebességének a mérése. Ezzel szemben a módszer alkalmasnak bizonyult a nagyobb méretű glukuronidok (ösztadiol-17 β -D-glukuronid, fenolftalein- β -D-glukuronid, M3G) vizsgálatára. Az alkalmazott legnagyobb konjugátum, az M3G az ER membránján feltűnően lassan jut át; a transzport sebessége két nagyságrenddel kisebbnek adódott, mint az ösztadiol-17 β -D-glukuronid vagy a fenolftalein- β -D-glukuronid esetében [52]. A kifejezetten lassú transzport felveti annak a gyanúját, hogy a morfin biotranszformációja során luminálisan keletkező M3G az ER-ben reked. Összhangban áll ezzel a feltételezéssel az a korábbi vizsgálat is, amely elkülönült, intracelluláris M3G-készlet jelenlétét bizonyítja a morfint konjugáló hepatocitákban [71].

Az M3G feltételezett luminális akkumulációját patkány máj mikroszómán vizsgáltuk. Ehhez a morfin glukuronsavas konjugációja során újonnan keletkező M3G luminális hányadát LC-MS segítségével meghatároztuk.

Eredményeink azt mutatták, hogy *in situ* glukuronidáció esetén, ép membrán mellett a vezikulumok M3G-koncentrációja az egyensúlyi koncentrációnál jóval magasabb értéket ér el (10. ábra). A kísérlet első perceiben a luminális M3G-mennyiség gyorsan nőtt, azonban 8-10 perc után ez a növekedés megállt. Ettől a ponttól kezdve a hosszabb inkubációs idők és magasabb teljes M3G-mennyiség ellenére a luminális M3G-tartalom nem nőtt tovább, hanem az elért magas koncentráción stagnált. A görbe tanúsága szerint tehát ebben az intervallumban a nagy kapacitással, azonban kis affinitással jellemzett M3G-transzport sebessége egyensúlyt tart a glukuronid szintézisével. Ha számszerűsítjük megfigyelésünket, a következő eredményt kapjuk: az *in situ* morfin-glukuronidáció során elért egyensúlyi állapotban az intraluminális M3G mennyisége körülbelül 70 pmol/mg fehérje volt (9. ábra). Ugyanilyen intraluminális koncentrációt a kívülről adott M3G esetében (100 perces inkubáció után, egyensúlyban) akkor értünk el, amikor a teljes minta M3G-tartalma 20 nmol/mg fehérje, azaz (tekintve az alkalmazott 1 mg/ml-es fehérjekoncentrációt) 20 μ M volt (6. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a 100 μ M morfin glukuronidációja során elért intraluminális M3G-koncentráció 20 μ M körül lehet. Méréseink szerint ennél a koncentrációnál az M3G-transzport sebessége körülbelül 40 pmol/perc/mg fehérje volt (8. ábra). Ugyanakkor a morfin-glukuronidáció sebességének vizsgálatakor 100 μ M szubsztrát mellett a szintézis sebességét 44,85 pmol/perc/mg

fehérjének találtuk (1. táblázat). A számolások eredményei tehát összhangban vannak, és szintén alátámasztják azt a feltevésünket, mely szerint a morfin glukuronidációjakor az újonnan keletkező M3G felhalmozódik a lumenben arra a szintre, amely mellett a kifelé irányuló transzport már lépést tud tartani az UGT aktivitásával.

Az általunk leírt jelenség egyben azt is jelenti, hogy a morfin eliminálását végző hepatociták ER-jében egy – a citoplazmától elhatárolt – dinamikus M3G-készlet épül fel, ami megmagyarázhatja azt a fent említett, korábbi megfigyelést, mely szerint az M3G a patkány májban elkülönült intracelluláris frakciót alkot. Annak ellenére, hogy az izolált, perfundált patkány májba retrográd intrabiliáris Triton X-100 injekciót fecskendeztek, és ezzel a hepatociták kanalikuláris membránját szelektíven elroncsolták, a sejtek M3G-tartalmának jelentős része érintetlen maradt [71]. Egy másik érdekes megfigyelés szerint a morfin UGT indukciója transz-stilbene-oxid [67, 68] vagy fenobarbitál segítségével [69, 70] a gyorsult ütemű morfin-glukuronidáció ellenére az M3G biliáris kiválasztásának csökkenését okozza. Az eredmények szerint a morfin UGT indukciója során az M3G-elimináció megváltozik, amiben szerepet játszhat az M3G lumen felhalmozódása és a lassú M3G-kiáramlás.

A major analgetikumként széles körben alkalmazott morfin biotranszformációja és – ezzel összefüggésben – a morfinmetabolitok biológiai aktivitása napjainkban sokat kutatott téma. A morfin a fenolos hidroxilcsoport glukuronsavas konjugációja során elveszíti fájdalomcsillapító hatását, mert az M3G nem kötődik a μ -opioid receptorhoz. Ugyanakkor a nagy dózisú morfinkezelés során megfigyelt, nem opioid receptor által mediált neurotoxikus mellékhatásokért (allodynia, hyperalgesia, myoclonus) ezt a metabolitot teszik elsősorban felelőssé [10]. Így a morfin-glukuronidáció sebessége, az M3G akkumulációja és transzportja jelentős szerepet játszik a morfinkezelés során tapasztalt terápiás hatások és a kezelést nehezítő mellékhatások fellépésében, erősségében, illetve időtartamában.

A morfin mellett számos egyéb gyógyszerként használt molekula, valamint endobiotikumok, toxikus vagy karcinogén vegyületek biotranszformációja történik glukuronsavas konjugáció segítségével. A glukuronidáció során ezen anyagok biológiai aktivitása, toxicitása módosul: az esetek jelentős részében csökken vagy teljesen elvész. A vegyületek ugyanakkor reaktiválódhatnak, és így biológiai hatásukat vagy toxicitásukat visszanyerhetik a glukuronozilcsoport enzimatis hidrolízise, vagyis a deglukuronidáció

során. Az UGT és a β -glukuronidáz aktivitása meghatározó szerepet játszik többek között a gyógyszerek hatástartamában és a kémiai karcinogenezisben. Utóbbit támasztja alá az egyes tumorok és a β -glukuronidáz aktivitása között megfigyelt korreláció is [45]. Ezzel összhangban áll az a megfigyelés is, hogy a gyümölcsökben és zöldségekben található D-glukarát ismert daganatmegelőző hatását a β -glukuronidáz gátlása révén fejt ki [50].

A deglukuronidáció folyamatának gátlószerei tehát orvosi szempontból a daganatmegelőzés eszközei lehetnek. A zöld tea flavanoljainak kemopreventív tulajdonsága jól ismert tény; háttérben számos különböző mechanizmust leírtak. Nem mutatták ki azonban a zöld tea katekinjeiről sem bakteriális, sem állati, sem humán sejteken, hogy a β -glukuronidáz enzimet közvetlenül gátolják. Patkányokban a zöld tea fogyasztásának hatására a bélbaktériumok glukuronidáz aktivitása csökkent. A 20% körüli gátlás pontos mértéke azonban erős összefüggésben állt az elfogyasztott tea szeléntartalmával, így a hatást nem tulajdoníthatjuk egyértelműen a polifenoloknak [106]. Ezzel szemben kísérleteink során kimutattuk, hogy a zöld tea polifenoljai izolált máj mikroszómában és intakt hepatoma sejtekben közvetve, a glukuronidtranszport gátlásán keresztül fékezik a deglukuronidáció sebességét. Így a flavanolok jelenlétében a karcinogén vegyületek reaktiválása csökkenhet, eliminációjuk pedig felgyorsulhat. Elképzelhető, hogy a zöld tea ismert tumorelles hatáshoz az általunk megfigyelt mechanizmus is hozzájárul.

Humán farmakokinetikai vizsgálatok szerint rendszeres zöld tea, illetve zöld tea kivonat fogyasztásával 4 μ M körüli plazma EGCG koncentráció érhető el [107, 108]. Ennél valamivel magasabb, $8,7 \pm 4,5$ μ M-os koncentrációt értek el az emberi plazmában, amennyiben az 1200 mg EGCG-t tartalmazó, egyszeri Polyphenon E (koffeinmentesített zöld tea kivonat) dózist éjszakai éhezés után, éhgyomorra fogyasztották el a vizsgált önkéntesek [109]. A zöld tea elfogyasztását követően 1,3 és 1,6 óra közötti idő elteltével észlelték a különböző katekinek maximális plazmakoncentrációját; az eliminációs féleletidő EGCG esetében 3,4 óra volt [110]. A tea polifenolok biológiai hasznosulása rendkívüli mértékben függ a tápláltsági állapottól [109] és a zöld teával együtt bevitt táplálék összetételétől [111], valamint jelentős egyéni különbségeket is megfigyeltek [112].

A tea flavanolok orális bejutás esetén jelentős „first pass” effektuson mennek keresztül. Már a vastagbélben bakteriális emésztésen esnek át, többek között a dihidropirán

gyűrű felhasítása után valerolaktonok keletkeznek. A bélhámsejtek enzimeinek segítségével szulfatált, metilált, glukuronsavas konjugátumok képződnek. Ezek a származékok a májban további biotranszformáción mennek keresztül; így a szisztémás keringésbe jutó, valamint a vizeletbe kiválasztódó vegyületeknek csak elenyésző hányadát képezik az eredeti katekinek. Sajnálatos módon a metabolitok biológiai aktivitását eddig nem vizsgálták, így ezek jelentőségét nem tudjuk felmérni [112, 113].

A katekinek rákmegelőző hatásának *in vitro* vizsgálatához, a szignál transzdukciós utak és az apoptózis tanulmányozásakor sejtes modellen az elérhető plazmaszintnél magasabb, 10 és 100 μM közötti EGCG-koncentráció alkalmazását az irodalom elfogadhatónak tartja [114-116]. Saját kísérleteink során is ebben a tartományban bizonyult az EGCG hatékonynak. Vizsgálatainkkor már 10 μM EGCG-t alkalmazva is a glukuronidtranszport több mint 40%-os gátlását észleltük (15. ábra). Ennek ellenére elképzelhető, hogy a zöld tea némely kísérleti körülmények között megfigyelt hatása csak a katekinek farmakológiai dóziséval érhető el. Ugyanakkor az *in vitro* és az *in vivo* megfigyelések a különböző koncentrációk ellenére egymással összhangban állnak, emellett a katekinek intraperitoneális injekciója után ugyanolyan metabolikus hatásokat figyelhetünk meg, mint a zöld tea szájon keresztüli elfogyasztása után. Mindez arra enged következtetni, hogy bár az EGCG plazmaszintje orális adagolást követően nem éri el az *in vitro* hatásos koncentrációt, *in vivo* a flavanoloak mégis kifejtik a hatásukat. Ennek egyik magyarázata lehet a katekinek feltételezett feldúsulása bizonyos sejtekben, sejtalkotókban; így lokálisan hatékony koncentrációt érhetnek el. Ezt támasztja alá, hogy kisagyi szemcsesejtekből izolált sejttenyészetben kimutatták az EGCG mitokondriális akkumulációját [84]. Fluoreszcensen jelölt EGCG segítségével emberi vena umbilicalis endotelsejteken vizsgálták a vegyület sejten belüli megoszlását. A citoszolban észlelt fluoreszcens mintázat arra utalt, hogy az EGCG egyes sejtalkotókban felhalmozódott, nagy valószínűséggel az ER-ben és a mitokondriumokban [85].

A fejezet végén egy metodikai kérdésre, a szacharolakton alkalmazására térek ki. A glukuronidáció és a glukuronidtranszport sebességének mérésekor számításba kell vennünk a mikroszomális β -glukuronidáz működését, mely a luminális glukuronid egy részét hidrolizálja. Tekintettel arra, hogy a glukuronidáció sebessége jellemzően 5-10-szer nagyobb, mint a hidrolízisé, az UGT aktivitásának mérésekor a glukuronidázgátló szacharolakton használatát rutinszerűen nem ajánlják [117]. Nem hanyagolhatjuk el

azonban a mikroszomális β -glukuronidáz működését a transzportmérések során (amikor UDP-glukuronsav hiányában a glukuronid nem keletkezik, csak bomolhat), így ebben az esetben az enzim szelektív gátlása (esetünkben szacharolakton segítségével) javasolt [7, 52]. Szacharolakton hozzáadása a mintákhoz a MUGA felvételének kezdeti sebességét nem módosította, így méréseink eredményét nem torzította (14. ábra). Jól látható ugyanakkor az is, hogy szacharolakton hiányában, amikor a β -glukuronidáz a luminális MUGA-t fogyasztja, az egyensúly jelentősen alacsonyabb glukuronidkoncentrációnál áll be. Ez a megfigyelés jól egyezik a latencia jelenségéből is levont következtetéssel, mely szerint a glukuronidtranszport a deglukuronidáció sebességmeghatározó tényezője. Amennyiben ugyanis a β -glukuronidázt nem gátoljuk, a glukuronidbeáramlás képtelen az enzimátikus hidrolízissel lépést tartani.

A MUGA-transzport vizsgálatához hasonlóan szacharolakton az M3G-vel végzett méréseink során is alkalmaztunk. Ezúttal azonban nemcsak a transzportméréseket, hanem a morfinglukuronidáció vizsgálatát is a gátlószer jelenlétében végeztük. Az *in situ* keletkező morfinglukuronid mikroszómához asszociált hányadának meghatározása után ugyanis eredményeinket összevetettük azokkal a mérésekkel, amikor kívülről adott M3G mellett, 100 perces inkubáció után mértük a vezikulumokhoz asszociált M3G-mennyiséget (10. ábra). Az utóbbi méréshez a hosszú inkubációs idő miatt a szacharolakton alkalmazása feltétlenül szükséges volt. A két kísérlet során kapott eredmények összehasonlíthatóságának érdekében a morfin glukuronidáció vizsgálatát is azonos kísérleti körülmények mellett, szacharolakton jelenlétében végeztük.

A morfin glukuronidációjának és az M3G transzportjának vizsgálata során is párhuzamos méréseket végeztünk a gátlószer jelenlétében és annak hiányában. Az eredmények azt mutatták, hogy a szacharolakton sem az M3G képződésének, sem transzportjának a sebességét nem befolyásolta jelentős mértékben (ezeket az adatokat a dolgozatban nem mutattam be).

10. Következtetések

Munkánk során az ER glukuronidtranszportját tanulmányoztuk. Megvizsgáltuk, hogy az M3G lassú kiáramlása lépést tud-e tartani a glukuronid keletkezésével, vagy a luminális morfinglukuronidáció során a termék felhalmozódik az organellum lumenében. Emellett kerestük a glukuronidtranszport gátló szerét. A konjugátum ER-be jutása ugyanis a deglukuronidáció sebességmeghatározó lépése, így gátlószerei közvetve fékezik az inaktivált karcinogén vegyületek reaktiválását, és ezáltal csökkenthetik a sejtek malignus transzformációjának kockázatát. Megvizsgáltuk, hogy a zöld tea flavanolak kemopreventív hatásához a fenti mechanizmus hozzájárulhat-e: befolyásolják-e a katekinek a mikroszomális β -glukuronidáz vagy a glukuronid-transzporter működését. Kíséreleteink során az alábbi következtetésekre jutottunk:

1. Megállapítottuk, hogy intakt patkány máj mikroszómában az *in situ* morfin-glukuronidáció során az egyensúlyi koncentrációnál jóval magasabb luminális M3G-koncentráció épül fel, tehát az M3G, a lassú kiáramlás következtében, a lumenben felhalmozódik.
2. Az újonnan keletkező M3G luminális felhalmozódása megmagyarázza azokat a korábbi eredményeket, melyek szerint a konjugátum a citoplazmától elkülönülten helyezkedik el a sejtben [61]; egyben felveti annak lehetőségét, hogy a glukuronidtranszport bizonyos esetekben a glukuronidáció sebességmeghatározó lépése lehet.
3. A gallo- és/vagy gallátcsoporttal rendelkező zöld tea flavanolak a mikroszomális glukuronidáz aktivitást jelentősen csökkentették ép membrán mellett, míg membránpermeabilizálás után egyedül a GCG fejtett ki szignifikáns hatást. A glukuronidbontást gátló hatást EGCG esetében intakt hepatoma sejteken is bizonyítottuk. Az általunk leírt jelenség, a deglukuronidáció – ép membrán mellett megfigyelt – gátlása hozzájárulhat a zöld tea ismert kemopreventív hatásához.

4. Közvetlen transzportmérések segítségével igazoltuk, hogy az EGCG fenti hatását a mikroszomális glukuronidtranszport gátlásán keresztül fejtí ki. Az általunk vizsgált glukuronid ER-membránon keresztüli mozgását a flavanol koncentrációfüggő módon gátolja. Azonosítottunk tehát egy, a korábban alkalmazott általános aniontranszport-gátló és tiol-alkiláló szereknél lényegesen specifikusabb, hatékony és nem toxikus gátlószert, amely a mindedig azonosítatlan glukuronid-transzporter(ek) további vizsgálata során hasznos segítséget nyújthat.

11. Összefoglalás

Az endoplazmás retikulum (ER) lumenében elhelyezkedő UDP-glukuronozil-transzferáz (UGT) és β -glukuronidáz enzimek aktivitása szorosan kapcsolódik a membránon keresztüli transzportoz. Az UGT-k termékei, illetve a β -glukuronidáz szubsztrátjai, a β -D-glukuronidok, fehérjemediált, passzív transzport segítségével jutnak át az ER membránján, ami az utóbbi enzim működésének sebességét is meghatározza. Fontossága ellenére – a technikai nehézségek miatt – a glukuronidtranszport alapos jellemzése és a közreműködő fehérjék azonosítása még várat magára.

Kimutattuk, hogy a morfin biotranszformációja során keletkező morfin-3-glukuronid (M3G) rendkívül lassú transzportja következtében az ER lumenében felhalmozódik. Megállapításunk összhangban áll azzal a korábbi megfigyeléssel, mely szerint az M3G a sejten belül elkülönült, a plazmamembrán szelektív elroncsolásával nem mobilizálható frakciót alkot; egyben felveti annak lehetőségét, hogy a glukuronidtranszport bizonyos esetekben a glukuronidáció sebességmeghatározó lépése is lehet.

Gyors szűrés módszerrel kimutattuk, hogy a tea flavanol epigallokatekin-gallát (EGCG) hatékonyan, koncentrációfüggő módon gátolja a metilumbelliferil-glukuronid (MUGA) mikroszomális felvételét, és ezáltal a mikroszomális β -glukuronidáz működését is fékezi. A deglukuronidáció gátlása a kémiai karcinogének reaktiválódását csökkenti, ami hozzájárulhat a zöld tea ismert rákmegelőző hatásához.

Az EGCG mint a glukuronid-transzporter gátlószere a későbbiekben hasznos eszköz lehet a fehérje vizsgálata, esetleg azonosítása során.

12. Summary

Activity of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) and β -glucuronidase enzymes is necessarily associated with transport processes due to their localization in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER). Transport of β -D-glucuronides – products of UGTs and substrates of β -glucuronidase – across the ER membrane was shown to be protein-mediated, and their uptake limits the activity of the latter enzyme. Despite its importance, due to the technical difficulties, glucuronide transport has not been exactly characterized yet, neither at functional, nor at molecular level.

We revealed the luminal accumulation of morphine-3-glucuronide (M3G) during morphine conjugation because of the extremely slow release of this glucuronide. Our observation is in accordance with earlier findings, which suggested the existence of separate intracellular M3G pools: a remarkable part of the intracellular M3G content was unaffected by the selective permeabilization of the apical plasma membrane. The observed accumulation suggests that transport of certain glucuronides might limit the rate of glucuronidation.

Using rapid filtration method, we detected that epigallocatechin-gallate (EGCG), the main green tea flavanol, significantly inhibit the microsomal uptake of methylumbelliferyl-glucuronide (MUGA) in a concentration-dependent manner. Via inhibition of glucuronide transport, flavanols also moderate the activity of β -glucuronidase. Blocking of deglucuronidation reduces the reactivation of chemical carcinogens, which might contribute to the known anti-cancer effect of green tea.

EGCG, as a novel specific inhibitor of microsomal glucuronide transport, might become a useful experimental tool for further investigation and identification of the yet unknown protein(s) involved.

13. Irodalomjegyzék

1. Csala M, Banhegyi G, Benedetti A. (2006) Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment. *FEBS Lett*, 580(9):2160-2165.
2. Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF. (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, 257(5076):1496-1502.
3. Czegle I, Piccirella S, Senesi S, Csala M, Mandl J, Banhegyi G, Fulceri R, Benedetti A. (2006) Cooperativity between 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase is based on a common pyridine nucleotide pool in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Endocrinol*, 248(1-2):24-25.
4. Meldolesi J, Pozzan T. (1998) The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci*, 23(1):10-14.
5. Banhegyi G, Bellomo G, Fulceri R, Mandl J, Benedetti A. (1993) Intraluminal calcium of the liver endoplasmic reticulum stimulates the glucuronidation of p-nitrophenol. *Biochem J*, 292 (Pt 1):99-104.
6. Csala M, Marcolongo P, Lizak B, Senesi S, Margittai E, Fulceri R, Magyar JE, Benedetti A, Banhegyi G. (2007) Transport and transporters in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 1768(6):1325-1341.
7. Staines AG, Burchell B, Banhegyi G, Mandl J, Csala M. (2005) Application of high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry to measure microsomal membrane transport of glucuronides. *Anal Biochem*, 342(1):45-52.
8. Arion WJ, Wallin BK, Carlson PW, Lange AJ. (1972) The specificity of glucose 6-phosphatase of intact liver microsomes. *J Biol Chem*, 247(8):2558-2565.

9. Smith MT. (2000) Neuroexcitatory effects of morphine and hydromorphone: evidence implicating the 3-glucuronide metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 27(7):524-528.
10. De Gregori S, De Gregori M, Ranzani GN, Allegri M, Minella C, Regazzi M. (2012) Morphine metabolism, transport and brain disposition. *Metab Brain Dis*, 27(1):1-5.
11. Nagar S, Rimmel RP. (2006) Uridine diphosphoglucuronosyltransferase pharmacogenetics and cancer. *Oncogene*, 25(11):1659-1672.
12. Ramirez J, Ratain MJ, Innocenti F. (2010) Uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferase genetic polymorphisms and response to cancer chemotherapy. *Future Oncol*, 6(4):563-585.
13. Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H, Yokoyama A, Saitoh S, Shimokata K, Hasegawa Y. (2000) Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res*, 60(24):6921-6926.
14. Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, Kocherginsky M, Karrison T, Janisch L, Ramirez J, Rudin CM, Vokes EE, Ratain MJ. (2004) Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol*, 22(8):1382-1388.
15. Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI. (2013) The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(6):1121-1132.
16. Sun XY, Plouzek CA, Henry JP, Wang TT, Phang JM. (1998) Increased UDP-glucuronosyltransferase activity and decreased prostate specific antigen production by biochanin A in prostate cancer cells. *Cancer Res*, 58(11):2379-2384.
17. Zheng Z, Park JY, Guillemette C, Schantz SP, Lazarus P. (2001) Tobacco carcinogen-detoxifying enzyme UGT1A7 and its association with orolaryngeal cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, 93(18):1411-1418.

18. Duguay Y, McGrath M, Lepine J, Gagne JF, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ, Plante M, Tetu B, Belanger A, Guillemette C, De Vivo I. (2004) The functional UGT1A1 promoter polymorphism decreases endometrial cancer risk. *Cancer Res*, 64(3):1202-1207.
19. Kohle C, Bock KW. (2009) Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Biochem Pharmacol*, 77(4):689-699.
20. Tephly TR, Burchell B. (1990) UDP-glucuronosyltransferases: a family of detoxifying enzymes. *Trends Pharmacol Sci*, 11(7):276-279.
21. Fulceri R, Banhegyi G, Gamberucci A, Giunti R, Mandl J, Benedetti A. (1994) Evidence for the intraluminal positioning of p-nitrophenol UDP-glucuronosyltransferase activity in rat liver microsomal vesicles. *Arch Biochem Biophys*, 309(1):43-46.
22. Zucker SD, Goessling W, Hoppin AG. (1999) Unconjugated bilirubin exhibits spontaneous diffusion through model lipid bilayers and native hepatocyte membranes. *J Biol Chem*, 274(16):10852-10862.
23. Bossuyt X, Blanckaert N. (1994) Carrier-mediated transport of intact UDP-glucuronic acid into the lumen of endoplasmic-reticulum-derived vesicles from rat liver. *Biochem J*, 302 (Pt 1):261-269.
24. Radomska A, Berg C, Treat S, Little JM, Lester R, Gollan JL, Drake RR. (1994) Characterization of UDP-glucuronic acid transport in rat liver microsomal vesicles with photoaffinity analogs. *Biochim Biophys Acta*, 1195(1):63-70.
25. Battaglia E, Gollan J. (2001) A unique multifunctional transporter translocates estradiol-17beta -glucuronide in rat liver microsomal vesicles. *J Biol Chem*, 276(26):23492-23498.
26. Hauser SC, Ziurys JC, Gollan JL. (1988) A membrane transporter mediates access of uridine 5'-diphosphoglucuronic acid from the cytosol into the endoplasmic

- reticulum of rat hepatocytes: implications for glucuronidation reactions. *Biochim Biophys Acta*, 967(2):149-157.
27. Ikushiro S, Emi Y, Kimura S, Iyanagi T. (1999) Chemical modification of rat hepatic microsomes with N-ethylmaleimide results in inactivation of both UDP-N-acetylglucosamine-dependent stimulation of glucuronidation and UDP-glucuronic acid uptake. *Biochim Biophys Acta*, 1428(2-3):388-396.
 28. Battaglia E, Radomska-Pandya A. (1998) A functional role for histidyl residues of the UDP-glucuronic acid carrier in rat liver endoplasmic reticulum membranes. *Biochemistry*, 37(1):258-263.
 29. Berg CL, Radomska A, Lester R, Gollan JL. (1995) Membrane translocation and regulation of uridine diphosphate-glucuronic acid uptake in rat liver microsomal vesicles. *Gastroenterology*, 108(1):183-192.
 30. Banhegyi G, Braun L, Marcolongo P, Csala M, Fulceri R, Mandl J, Benedetti A. (1996) Evidence for an UDP-glucuronic acid/phenol glucuronide antiport in rat liver microsomal vesicles. *Biochem J*, 315 (Pt 1):171-176.
 31. Lizak B, Czegle I, Csala M, Benedetti A, Mandl J, Banhegyi G. (2006) Translocon pores in the endoplasmic reticulum are permeable to small anions. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291(3):C511-517.
 32. Kobayashi T, Sleeman JE, Coughtrie MW, Burchell B. (2006) Molecular and functional characterization of microsomal UDP-glucuronic acid uptake by members of the nucleotide sugar transporter (NST) family. *Biochem J*, 400(2):281-289.
 33. Muraoka M, Kawakita M, Ishida N. (2001) Molecular characterization of human UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine transporter, a novel nucleotide sugar transporter with dual substrate specificity. *FEBS Lett*, 495(1-2):87-93.
 34. Banhegyi G, Garzo T, Fulceri R, Benedetti A, Mandl J. (1993) Latency is the major determinant of UDP-glucuronosyltransferase activity in isolated hepatocytes. *FEBS Lett*, 328(1-2):149-152.

35. Bossuyt X, Blanckaert N. (1997) Carrier-mediated transport of uridine diphosphoglucuronic acid across the endoplasmic reticulum membrane is a prerequisite for UDP-glucuronosyltransferase activity in rat liver. *Biochem J*, 323 (Pt 3):645-648.
36. Zhen L, Baumann H, Novak EK, Swank RT. (1993) The signal for retention of the egasyn-glucuronidase complex within the endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys*, 304(2):402-414.
37. Brunelle FM, Verbeeck RK. (1997) Conjugation-deconjugation cycling of diflunisal via beta-glucuronidase catalyzed hydrolysis of its acyl glucuronide in the rat. *Life Sci*, 60(22):2013-2021.
38. Sharifi N, Auchus RJ. (2012) Steroid biosynthesis and prostate cancer. *Steroids*, 77(7):719-726.
39. Marcolongo P, Senesi S, Gava B, Fulceri R, Sorrentino V, Margittai E, Lizak B, Csala M, Banhegyi G, Benedetti A. (2008) Metyrapone prevents cortisone-induced preadipocyte differentiation by depleting luminal NADPH of the endoplasmic reticulum. *Biochem Pharmacol*, 76(3):382-390.
40. Hughes KA, Manolopoulos KN, Iqbal J, Cruden NL, Stimson RH, Reynolds RM, Newby DE, Andrew R, Karpe F, Walker BR. (2012) Recycling between cortisol and cortisone in human splanchnic, subcutaneous adipose, and skeletal muscle tissues in vivo. *Diabetes*, 61(6):1357-1364.
41. Maia AL, Goemann IM, Meyer EL, Wajner SM. (2011) Deiodinases: the balance of thyroid hormone: type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. *J Endocrinol*, 209(3):283-297.
42. Purohit A, Foster PA. (2012) Steroid sulfatase inhibitors for estrogen- and androgen-dependent cancers. *J Endocrinol*, 212(2):99-110.
43. Whiting JF, Narciso JP, Chapman V, Ransil BJ, Swank RT, Gollan JL. (1993) Deconjugation of bilirubin-IX alpha glucuronides: a physiologic role of hepatic microsomal beta-glucuronidase. *J Biol Chem*, 268(31):23197-23201.

44. Vitek L, Jirsa M, Brodanova M, Kalab M, Marecek Z, Danzig V, Novotny L, Kotal P. (2002) Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis*, 160(2):449-456.
45. Boyland E, Gasson JE, Williams DC. (1957) Enzyme activity in relation to cancer; the urinary beta-glucuronidase activity of patients suffering from malignant disease. *Br J Cancer*, 11(1):120-129.
46. Pearson JP, Pretlow TP, Bradley EL, Jr., McGinnis MC, Pretlow TG. (1989) Beta-glucuronidase activity in prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Cancer*, 64(4):911-915.
47. Murdter TE, Sperker B, Kivisto KT, McClellan M, Fritz P, Friedel G, Linder A, Bosslet K, Toomes H, Dierkesmann R, Kroemer HK. (1997) Enhanced uptake of doxorubicin into bronchial carcinoma: beta-glucuronidase mediates release of doxorubicin from a glucuronide prodrug (HMR 1826) at the tumor site. *Cancer Res*, 57(12):2440-2445.
48. Stachulski AV, Meng X. (2013) Glucuronides from metabolites to medicines: a survey of the in vivo generation, chemical synthesis and properties of glucuronides. *Nat Prod Rep*, 30(6):806-848.
49. Legigan T, Clarhaut J, Renoux B, Tranoy-Opalinski I, Monvoisin A, Berjeaud JM, Guilhot F, Papot S. (2012) Synthesis and antitumor efficacy of a beta-glucuronidase-responsive albumin-binding prodrug of doxorubicin. *J Med Chem*, 55(9):4516-4520.
50. Hanausek M, Walaszek Z, Slaga TJ. (2003) Detoxifying cancer causing agents to prevent cancer. *Integr Cancer Ther*, 2(2):139-144.
51. Csala M, Banhegyi G, Braun L, Szirmai R, Burchell A, Burchell B, Benedetti A, Mandl J. (2000) Beta-glucuronidase latency in isolated murine hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, 59(7):801-805.

52. Csala M, Staines AG, Banhegyi G, Mandl J, Coughtrie MW, Burchell B. (2004) Evidence for multiple glucuronide transporters in rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 68(7):1353-1362.
53. Wlcek K, Hofstetter L, Stieger B. (2014) Transport of estradiol-17beta-glucuronide, estrone-3-sulfate and taurocholate across the endoplasmic reticulum membrane: evidence for different transport systems. *Biochem Pharmacol*, 88(1):106-118.
54. Waddell ID, Robertson K, Burchell A, Hume R, Burchell B. (1995) Evidence for glucuronide (small molecule) sorting by human hepatic endoplasmic reticulum. *Mol Membr Biol*, 12(3):283-288.
55. Norn S, Kruse PR, Kruse E. (2005) [History of opium poppy and morphine]. *Dan Medicinhist Arbog*, 33:171-184.
56. Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. (2006) Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain*, 10(4):287-333.
57. Langley PC. (2011) The prevalence, correlates and treatment of pain in the European Union. *Curr Med Res Opin*, 27(2):463-480.
58. Colson J, Koyyalagunta D, Falco FJ, Manchikanti L. (2011) A systematic review of observational studies on the effectiveness of opioid therapy for cancer pain. *Pain Physician*, 14(2):E85-102.
59. Cherubino P, Sarzi-Puttini P, Zuccaro SM, Labianca R. (2012) The management of chronic pain in important patient subgroups. *Clin Drug Investig*, 32 Suppl 1:35-44.
60. Coffman BL, Rios GR, King CD, Tephly TR. (1997) Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation. *Drug Metab Dispos*, 25(1):1-4.

61. Coughtrie MW, Ask B, Rane A, Burchell B, Hume R. (1989) The enantioselective glucuronidation of morphine in rats and humans. Evidence for the involvement of more than one UDP-glucuronosyltransferase isoenzyme. *Biochem Pharmacol*, 38(19):3273-3280.
62. Osborne R, Joel S, Trew D, Slevin M. (1990) Morphine and metabolite behavior after different routes of morphine administration: demonstration of the importance of the active metabolite morphine-6-glucuronide. *Clin Pharmacol Ther*, 47(1):12-19.
63. Yamada H, Ishii K, Ishii Y, Ieiri I, Nishio S, Morioka T, Oguri K. (2003) Formation of highly analgesic morphine-6-glucuronide following physiologic concentration of morphine in human brain. *J Toxicol Sci*, 28(5):395-401.
64. King CD, Rios GR, Green MD, MacKenzie PI, Tephly TR. (1997) Comparison of stably expressed rat UGT1.1 and UGT2B1 in the glucuronidation of opioid compounds. *Drug Metab Dispos*, 25(2):251-255.
65. Rane A, Gawronska-Szklarz B, Svensson JO. (1985) Natural (-)- and unnatural (+)- enantiomers of morphine: comparative metabolism and effect of morphine and phenobarbital treatment. *J Pharmacol Exp Ther*, 234(3):761-765.
66. Meringolo M, Brusadin V, De Luca MT, Montanari C, Antonilli L, Nencini P, Badiani A. (2012) Induction of morphine-6-glucuronide synthesis by heroin self-administration in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 221(2):195-203.
67. Fuhrman-Lane C, Fujimoto JM. (1982) Trans-stilbene oxide administration increased hepatic glucuronidation of morphine but decreased biliary excretion of morphine glucuronide in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 222(3):526-533.
68. Fuhrman-Lane C, Fujimoto JM. (1982) Effects of trans-stilbene oxide treatment on biliary excretion of xenobiotics in the rat. *Drug Metab Dispos*, 10(5):505-509.
69. Peterson RE, Fujimoto JM. (1973) Biliary excretion of morphine-3-glucuronide and morphine-3-etheral sulfate by different pathways in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 184(2):409-418.

70. Roerig DL, Hasegawa AT, Peterson RE, Wang RI. (1974) Effect of chloroquine and phenobarbital on morphine glucuronidation and biliary excretion in the rat. *Biochem Pharmacol*, 23(8):1331-1339.
71. Sweeney EF, Fuhrman-Lane C, Fujimoto JM. (1984) Morphine-morphine glucuronide pools in the rat liver: effects of Triton X-100. *J Pharmacol Exp Ther*, 228(1):19-27.
72. van de Wetering K, Zelcer N, Kuil A, Feddema W, Hillebrand M, Vlaming ML, Schinkel AH, Beijnen JH, Borst P. (2007) Multidrug resistance proteins 2 and 3 provide alternative routes for hepatic excretion of morphine-glucuronides. *Mol Pharmacol*, 72(2):387-394.
73. Ouellet DM, Pollack GM. (1995) Biliary excretion and enterohepatic recirculation of morphine-3-glucuronide in rats. *Drug Metab Dispos*, 23(4):478-484.
74. Choonara I, Ekblom Y, Lindstrom B, Rane A. (1990) Morphine sulphation in children. *Br J Clin Pharmacol*, 30(6):897-900.
75. Cabrera C, Artacho R, Gimenez R. (2006) Beneficial effects of green tea--a review. *J Am Coll Nutr*, 25(2):79-99.
76. Han KC, Wong WC, Benzie IF. (2011) Genoprotective effects of green tea (*Camellia sinensis*) in human subjects: results of a controlled supplementation trial. *Br J Nutr*, 105(2):171-179.
77. Ramos S. (2007) Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem*, 18(7):427-442.
78. Noonan DM, Benelli R, Albini A. (2007) Angiogenesis and cancer prevention: a vision. *Recent Results Cancer Res*, 174:219-224.
79. Khan N, Mukhtar H. (2010) Cancer and metastasis: prevention and treatment by green tea. *Cancer Metastasis Rev*, 29(3):435-445.

80. Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC. (1997) The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 37(8):693-704.
81. Graham HN. (1992) Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med*, 21(3):334-350.
82. Del Rio D, Stewart AJ, Mullen W, Burns J, Lean ME, Brighenti F, Crozier A. (2004) HPLC-MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *J Agric Food Chem*, 52(10):2807-2815.
83. Lambert JD. (2013) Does tea prevent cancer? Evidence from laboratory and human intervention studies. *Am J Clin Nutr*, 98(6):1667S-1675S.
84. Schroeder EK, Kelsey NA, Doyle J, Breed E, Bouchard RJ, Loucks FA, Harbison RA, Linseman DA. (2009) Green tea epigallocatechin 3-gallate accumulates in mitochondria and displays a selective antiapoptotic effect against inducers of mitochondrial oxidative stress in neurons. *Antioxid Redox Signal*, 11(3):469-480.
85. Piyaviriyakul S, Shimizu K, Asakawa T, Kan T, Siripong P, Oku N. (2011) Anti-angiogenic activity and intracellular distribution of epigallocatechin-3-gallate analogs. *Biol Pharm Bull*, 34(3):396-400.
86. Gamberucci A, Konta L, Colucci A, Giunti R, Magyar JE, Mandl J, Banhegyi G, Benedetti A, Csala M. (2006) Green tea flavonols inhibit glucosidase II. *Biochem Pharmacol*, 72(5):640-646.
87. Magyar JE, Gamberucci A, Konta L, Margittai E, Mandl J, Banhegyi G, Benedetti A, Csala M. (2009) Endoplasmic reticulum stress underlying the pro-apoptotic effect of epigallocatechin gallate in mouse hepatoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(3):694-700.
88. Konta L, Szaraz P, Magyar JE, Revesz K, Banhegyi G, Mandl J, Csala M. (2011) Inhibition of glycoprotein synthesis in the endoplasmic reticulum as a novel anticancer mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Biofactors*, 37(6):468-476.

89. Healy SJ, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A. (2009) Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *Eur J Pharmacol*, 625(1-3):234-246.
90. Malhotra JD, Kaufman RJ. (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol*, 18(6):716-731.
91. Brostrom MA, Brostrom CO. (2003) Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability. *Cell Calcium*, 34(4-5):345-363.
92. Jin YR, Im JH, Park ES, Cho MR, Han XH, Lee JJ, Lim Y, Kim TJ, Yun YP. (2008) Antiplatelet activity of epigallocatechin gallate is mediated by the inhibition of PLCgamma2 phosphorylation, elevation of PGD2 production, and maintaining calcium-ATPase activity. *J Cardiovasc Pharmacol*, 51(1):45-54.
93. Kargacin ME, Emmett TL, Kargacin GJ. (2011) Epigallocatechin-3-gallate has dual, independent effects on the cardiac sarcoplasmic reticulum/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. *J Muscle Res Cell Motil*, 32(2):89-98.
94. Wang JH, Cheng J, Li CR, Ye M, Ma Z, Cai F. (2011) Modulation of Ca Signals by Epigallocatechin-3-gallate(EGCG) in Cultured Rat Hippocampal Neurons. *Int J Mol Sci*, 12(1):742-754.
95. Kim HJ, Yum KS, Sung JH, Rhie DJ, Kim MJ, Min DS, Hahn SJ, Kim MS, Jo YH, Yoon SH. (2004) Epigallocatechin-3-gallate increases intracellular [Ca²⁺] in U87 cells mainly by influx of extracellular Ca²⁺ and partly by release of intracellular stores. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 369(2):260-267.
96. Csala M, Margittai E, Senesi S, Gamberucci A, Banhegyi G, Mandl J, Benedetti A. (2007) Inhibition of hepatic glucose 6-phosphatase system by the green tea flavanol epigallocatechin gallate. *FEBS Lett*, 581(8):1693-1698.

97. Szelenyi P, Revesz K, Konta L, Tutto A, Mandl J, Kereszturi E, Csala M. (2013) Inhibition of microsomal cortisol production by (-)-epigallocatechin-3-gallate through a redox shift in the endoplasmic reticulum--a potential new target for treating obesity-related diseases. *Biofactors*, 39(5):534-541.
98. Henne V, Soling HD. (1986) Guanosine 5'-triphosphate releases calcium from rat liver and guinea pig parotid gland endoplasmic reticulum independently of inositol 1,4,5-trisphosphate. *FEBS Lett*, 202(2):267-273.
99. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1):265-275.
100. Benedetti A, Fulceri R, Romani A, Comporti M. (1988) MgATP-dependent glucose 6-phosphate-stimulated Ca²⁺ accumulation in liver microsomal fractions. Effects of inositol 1,4,5-trisphosphate and GTP. *J Biol Chem*, 263(7):3466-3473.
101. Burchell A, Hume R, Burchell B. (1988) A new microtechnique for the analysis of the human hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system. *Clin Chim Acta*, 173(2):183-191.
102. Pan J, Tieleman DP, Nagle JF, Kucerka N, Tristram-Nagle S. (2009) Alamethicin in lipid bilayers: combined use of X-ray scattering and MD simulations. *Biochim Biophys Acta*, 1788(6):1387-1397.
103. Levvy GA. (1952) The preparation and properties of beta-glucuronidase. IV. Inhibition by sugar acids and their lactones. *Biochem J*, 52(3):464-472.
104. Motulsky H, Christopoluos, A. (2004) Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. . New York: Oxford University Press.
105. van Schaftingen E, Gerin I. (2002) The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J*, 362(Pt 3):513-532.
106. Molan AL, Liu Z, Tiwari R. (2010) The ability of green tea to positively modulate key markers of gastrointestinal function in rats. *Phytother Res*, 24(11):1614-1619.

107. Chow HH, Cai Y, Hakim IA, Crowell JA, Shahi F, Brooks CA, Dorr RT, Hara Y, Alberts DS. (2003) Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res*, 9(9):3312-3319.
108. Miyazawa T. (2000) Absorption, metabolism and antioxidative effects of tea catechin in humans. *Biofactors*, 13(1-4):55-59.
109. Chow HH, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Ranger-Moore J, Chew WM, Celaya CA, Rodney SR, Hara Y, Alberts DS. (2005) Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res*, 11(12):4627-4633.
110. Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS. (2002) Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11(10 Pt 1):1025-1032.
111. Monobe M, Ema K, Tokuda Y, Maeda-Yamamoto M. (2011) Increased plasma concentration of epigallocatechin in mice after orally administering a green tea (*Camellia sinensis* L.) extract supplemented by steamed rice. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75(1):152-154.
112. Del Rio D, Calani L, Cordero C, Salvatore S, Pellegrini N, Brighenti F. (2010) Bioavailability and catabolism of green tea flavan-3-ols in humans. *Nutrition*, 26(11-12):1110-1116.
113. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. (2013) Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*, 18(14):1818-1892.
114. Demeule M, Michaud-Levesque J, Annabi B, Gingras D, Boivin D, Jodoin J, Lamy S, Bertrand Y, Beliveau R. (2002) Green tea catechins as novel antitumor and antiangiogenic compounds. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2(4):441-463.

115. Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. (2006) Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res*, 66(5):2500-2505.
116. Lambert JD, Yang CS. (2003) Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J Nutr*, 133(10):3262s-3267s.
117. Oleson L, Court MH. (2008) Effect of the beta-glucuronidase inhibitor saccharolactone on glucuronidation by human tissue microsomes and recombinant UDP-glucuronosyltransferases. *J Pharm Pharmacol*, 60(9):1175-1182.

14. Saját publikációk jegyzéke

14.1. A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

Révész K, Tüttö A, Margittai É, Bánhegyi G, Magyar JÉ, Mandl J, Csala M.

(2007) Glucuronide transport across the endoplasmic reticulum membrane is inhibited by epigallocatechin gallate and other green tea polyphenols

Int J Biochem Cell Biol, 39: 922-930 IF: 4,009

Révész K, Tóth B, Staines AG, Coughtrie MW, Mandl J, Csala M.

(2013) Luminal accumulation of newly synthesized morphine-3-glucuronide in rat liver microsomal vesicles

Biofactors, 39(3): 271-278 IF: 3,088

14.2. A disszertáció témájához nem kapcsolódó közlemények

Révész K, Tüttö A, Konta L.

(2007) Zöldtea-flavanolok hatása az endoplazmás retikulum működésére

Orv Hetil, 148(40):1903-1907.

Révész K, Tüttö A, Szelényi P, Konta L.

(2011) Tea flavan-3-ols as modulating factors in endoplasmic reticulum function

Nutr Res, 31(10): 731-740 IF: 1,974

Konta L, Száraz P, Magyar JÉ, **Révész K**, Bánhegyi G, Mandl J, Csala M.

(2011) Inhibition of glycoprotein synthesis in the endoplasmic reticulum as a novel anticancer mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate

Biofactors, 37(6): 468-476 IF: 4,933

Szelényi P, **Révész K**, Konta L, Tüttö A, Mandl J, Kereszturi E, Csala M.

(2013) Inhibition of microsomal cortisol production by (-)-epigallocatechin-3-gallate through a redox shift in the endoplasmic reticulum - A potential new target for treating obesity-related diseases

Biofactors, 39(5): 534-541 IF: 3,088

15. Köszönetnyilvánítás

Nagy szeretettel köszönöm témavezetőmnek, Csala Miklósnak, hogy már diákkörös koromtól irányítása alatt dolgozhattam, és rengeteget tanulhattam tőle. Bármikor fordulhattam hozzá szakmai segítségért, humorának, türelmének és bizalmának köszönhetően munkacsoportjában öröm volt a kutatás.

Köszönettel tartozom Mandl és Bánhegyi professzor uraknak, amiért lehetővé tették, hogy PhD-munkámat az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetben végezzem.

Köszönöm Tüttő Annának, hogy együtt kezdtük a glukuronidtranszportot vizsgálni és sok kísérletet közösen végeztünk. Köszönet illeti kooperációs partnerünket, a Dundee-i Egyetem kutatócsoportját, ahol Adam G. Staines és Michael W. H. Coughtrie segítségével a mérések egy része készült.

Hálás vagyok a labor tagjainak segítőkészségükért, a különböző metodikák megtanításáért, a vidám légkörben zajló munkáért. Köszönetet szeretnék mondani Mészáros Tamásnak az irányításával végzett kísérletekért, szakmai és emberi támogatásáért. Mile Valériának köszönöm a kísérletek során nyújtott technikai segítséget és Sonnevend Kingának a fokozatszerzési eljárás megszervezésében nyújtott segítséget.