

Antioxidáns szteroidok szerepe a bakteriális infekciók lefolyásában: szteroid hatásterkezetű összefüggés az antioxidáns és teljes gyökfogó hatás tekintetében

Doktori tézisek

Dr. Stark Júlia
Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Programvezető: Prof. Dr. Rácz Károly, D.Sc., egyetemi tanár
Témavezető: Dr. Békési Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Kristóf Katalin, Ph.D., részleg vezető szakorvos

Dr. Kovács Gábor, Ph.D., szakmai profilvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Blázovics Anna, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Halász Zita, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Molnár Jeannette, Ph.D., szakorvos

Budapest
2015

I. BEVEZETÉS

A civilizált társadalmak nagy problémája korunkban a főként a helytelen életmódból következő krónikus betegségek növekvő gyakorisága. Ezen kórképek közös patogenetikai tényezője a reaktív oxigén származékok fokozott termelődése és elégtelen semlegesítése következtében kialakuló oxidatív stressz. Bár számos antioxidáns hatású gyógyszer és étrendkiegészítő van forgalomban, ezeknek a jótékony hatása az említett kórképekben nem bizonyított. Az ösztradiolról és több más, a mellékvesekéregben, herében, petefészekben termelődő szteroid szerkezetű hormonról kimutatták, hogy szintén antioxidáns tulajdonsággal bír.

A hormon kezelés – a hormonhiányos állapotokban szükséges szupplementáció kivételével – számos, bizonyos esetekben kedvezőtlen anyagcsere hatása miatt nem elfogadható a krónikus betegségek kiegészítő terápiájaként. A szteroid hormonok antioxidáns tulajdonságának és hatás-szerkezeti összefüggéseinek pontosabb megismerésével azonban olyan molekulák fejlesztése válhat lehetővé, amelyek a káros szteroid hatások nélkül javítják az oxidatív státuszt.

Kutatócsoportunk korábbi eredményeire támaszkodva dolgozatomban néhány hormon *in vivo* antioxidáns hatását, valamint egy szintetikus szteroid, az ösztrogén, progesztagén és androgén hatással egyaránt rendelkező tibolon és metabolitjainak *ex vivo* szuperoxid csökkentő képességét vizsgáltam.

A bakteriális vérmérgezés (szepszis) súlyos formái a korszerű antibiotikus kezelés mellett is magas mortalitással járnak. A súlyos szepszishez és szeptikus sokkhoz gyakran társul kortikoszteroid elégtelenség, melynek hátterében elégtelen kortizol termelés, megváltozott kortizol metabolizmus, a kortizol hatásra való szöveti rezisztencia vagy mellékvese endothel működészavar állhat. Az elégtelen intracelluláris kortizol aktivitás eredménye a túlzott gyulladáshoz vezető válasz vagy a pro- és antiinflammatorikus mediátorok egyensúlyának megbomlása. Ebben az állapotban a kis dóziséjú glukokortikoid pótlás jótékony hatású lehet, és olyan betegeknél, akiknél a megfelelő folyadékpótlás és vazopresszor terápia nem elegendő a hemodinamikai stabilitás fenntartásához, ajánlott is. Egyéb szteroid hormonokat ilyen indikációval nem használ a klinikum, azonban többek között az ösztrogénnek és

tesztoszteronnak is ismert bizonyos immunmoduláns hatása. Ezek a hormonok közvetlenül hatnak az immunrendszer több sejttípusára, valamint neutrofil granulocitákban fokozzák a mieloperoxidáz (MPO) aktivitását. A MPO elsődleges fiziológiai szerepe a granulocita aktivációja során a szabad gyökök termelésének katalizálása és a fagocitált baktérium elpusztítása, emellett kutatócsoportunk korábbi munkája során a MPO bizonyos antioxidáns hatását is leírta. A MPO gátlószerét, az indometacint gyulladáscsökkentő szerként alkalmazzák a vázrendszeri megbetegedésekben a klinikumban. Korábbi eredményeink szerint az indometacin felfüggeszti az antioxidáns szteroid hormonok szuperoxid csökkentő hatását izolált granulocitákon. Ez szintén alátámasztja azt a feltételezésünket, hogy a szteroid hormonok antioxidáns hatása legalábbis részben a MPO aktivitás fokozásán keresztül valósul meg.

II. CÉLKITŰZÉS

A szteroid szerkezetű hormonok pontosabb hatásának megismerése érdekében dolgozatomban a következő kérdésekre kerestem a választ:

1. A posztmenopauzás hormonpótlásra használt szintetikus szteroid, a tibolon és metabolitjai hogyan befolyásolják aktivált humán neutrofil granulociták szuperoxid termelését *ex vivo*?
2. Az izolált granulocitákon antioxidáns hatást mutató kortizol és kortikoszteron ezen tulajdonsága megmutatkozik-e *in vivo* körülmények között is?

A mieloperoxidázzal és ennek aktivitására ható szteroid hormonokkal és indometacinnal végzett korábbi kutatások folytatásaként az alábbi kérdések merültek fel:

3. Hogyan hatnak egyes antioxidáns szteroid hormonok, a MPO és az indometacin izolált és fertőzött granulociták baktericid funkciójára?
4. Hogyan befolyásolja az indometacin, ösztradiol és tesztoszteron kezelés a gyulladáshoz kapcsolódó paramétereket és bakteriémiát patkány szepszis modellen?

III. MÓDSZEREK

A tibolon és származékainak hatása a szuperoxid termelésre

Egészséges önkéntestől vett vérből izolált neutrofil granulocitákat két órán keresztül inkubáltunk 37°C-on a következő hatóanyagok jelenlétében: tibolon, 3 α -hidroxitibolon, 3 β -hidroxitibolon, Δ^4 -tibolon, 3 α -tibolon-szulfát, 3 α -17 β -tibolon-diszulfát, 3 β -tibolon-szulfát, 3 β -17 β -tibolon-diszulfát, valamint referenciaként ösztradiol.

A sejtek szuperoxid termelését fMLP-vel történt stimuláció után a hozzáadott citokróm-c redukciójával, fotometriás módszerrel mértük. Az optikai denzitásváltozást átszámítottuk „nmol szuperoxid/10⁶ sejt”-re, a különböző szteroidok esetén mért eredményeket a kontroll százalékában adtuk meg.

Az *ex vivo* eredmények alátámasztására a vegyületeket egy sejtmentes szuperoxid termelő rendszerben, a xantin – xantin-oxidáz reakcióban is vizsgáltuk.

Az egyes kezelések és a kontrollok összehasonlítását az általános lineáris modellel és Dunnett próbával végeztük.

A kortikoszteron és kortizol gyökfogó hatásának vizsgálata

A kísérlethez 16 db felnőtt hím Sprague-Dawley patkányt használtunk. Az állatokat négy csoportra osztottuk: kezeletlen kontroll, lipiddús tápon tartott kontroll, kortizollal ill. kortikoszteronnal kezelt lipiddús tápon tartott csoportok. A kezelés előtt és a 28. napon vett vérből meghatározzuk a teljes gyökfogó kapacitást kemilumineszcenciás módszerrel. A plazma minták relatív lumineszcenciáját egy vak kontrollhoz képest határoztuk meg, és relatív lumineszcencia (relative light unit, RLU) egységben fejeztük ki. Az alacsonyabb RLU magasabb gyökfogó kapacitást jelent.

A csoportok 0. és 28. napi plazma mintájából mért átlagos RLU értékeit kétmintás, párosított t-próbával hasonlítottam össze (SPSS v. 12 szoftvercsomag).

Az indometacin és egyes szteroid hormonok hatása az intracelluláris baktérium ölésre

Egészséges önkéntesek véréből granulocitákat izoláltunk, majd a sejtszuspenziókat 2 órán keresztül, 37°C-on inkubáltuk indometacin, MPO, 17 β -ösztradiol vagy kortizol jelenlétében. Ezt követően opsonizált *E.coli*

baktériummal hoztuk össze a sejteket, és acridin narancs festés után UV mikroszkóp alatt vizsgáltuk az intracelluláris bakteriális killinget. Az UV fényben fluoreszkáló elölt baktériumokat megszámláltuk, és az eredményt a kontroll százalékában adtuk meg.

Az indometacin, ösztradiol és tesztoszteron hatásának vizsgálata *P. multocida* infekció után állatmodellen

A vizsgálathoz hím Wistar patkányokat használtunk, és a következő kezeléseket alkalmaztuk:

Ii: indometacinnal kezelt és *P. multocidával* fertőzött csoport

I0 csoport: indometacinnal kezelt kontroll

Mi: az indometacin oldószerével kezelt, fertőzött csoport

M0: az indometacin oldószerével kezelt kontroll

CT: kasztrált, tesztoszteronnal kezelt, fertőzött csoport

CE: kasztrált, ösztradiollal kezelt, fertőzött csoport

C0: kasztrált, a hormonok oldószerével kezelt, fertőzött csoport

NT: tesztoszteronnal kezelt, fertőzött csoport

N0: a hormonok oldószerével kezelt, fertőzött csoport

A fertőzés utáni 2. (indometacinos kezelés), ill. 3. (hormonális kezelés) napon vett vérből meghatároztuk a vérképet és gyulladási paramétereit. A fertőzött állatok májából és szívvéréből véres agaron visszaizoláltuk a fertőző törzset.

A laboratóriumi eredmények összehasonlítására ANOVA-t ill. Kruskal-Wallis tesztet és LSD post hoc tesztet alkalmaztunk (Statistica).

IV. EREDMÉNYEK

A tibolon és származékainak hatása a szuperoxid termelésre

A granulociták szuperoxid termelése a 10^{-9} M koncentrációjú szteroid kezelés után nem tért el szignifikánsan a kontrolltól egyik szteroid vegyület esetében sem. 10^{-8} M koncentráció esetén az ösztradiol ($80,9 \pm 2,5\%$, $p < 0,05$), a 3β -tibolon-szulfát ($83,3 \pm 4,7\%$, $p < 0,05$) és a 3β - 17β -tibolon-diszulfát ($81,0 \pm 4,2\%$, $p < 0,05$) csökkentette szignifikánsan a szuperoxid termelést a kontrollhoz viszonyítva. 10^{-7} M koncentrációnál több metabolitnál figyeltünk meg ilyen hatást: ösztradiol ($76,4 \pm 4,2\%$, $p < 0,001$), 3β -hidroxitibolon ($82,9 \pm 5,3\%$, $p < 0,05$), 3α -tibolon-szulfát ($81,1 \pm 4,4\%$, $p < 0,05$), 3β -tibolon-szulfát ($79,2 \pm 5,7\%$, $p < 0,01$), 3β - 17β -tibolon-diszulfát ($74,6 \pm 5,1\%$, $p < 0,0001$). A többi szteroid metabolit (tibolon, 3α -hidroxitibolon, Δ^4 -tibolon, 3α - 17β -tibolon-diszulfát) nem csökkentette szignifikánsan a granulociták szuperoxid produkcióját az említett koncentrációkban.

A xantin – xantin-oxidáz rendszerben a hormonokat csak 10^{-7} M koncentrációban vizsgáltuk. Szignifikáns

szuperoxid csökkenést észleltünk az ösztradiol ($67,4 \pm 1,0\%$, $p < 0,05$), 3α -tibolon-szulfát ($85,8 \pm 5,3\%$, $p < 0,05$), 3α - 17β -tibolon-diszulfát ($71,9 \pm 2,5\%$, $p < 0,05$), 3β -tibolon-szulfát ($73,9 \pm 5,0\%$, $p < 0,05$) és 3β - 17β -tibolon-diszulfát ($65,8 \pm 3,4\%$, $p < 0,05$) esetében, a kontrollhoz (100%) viszonyítva. A többi szteroid metabolit nem vezetett szignifikáns szuperoxid csökkenéshez ebben a rendszerben.

Az indometacin és egyes szteroid hormonok hatása az intracelluláris baktérium ölésre

Indometacin kezelés hatására nem változott a neutrofilek baktériumölő képessége a kontrollhoz képest ($103,3 \pm 47,6\%$). Ezzel szemben a MPO, ösztradiol és kortizol változó mértékben fokozta a baktériumölő kapacitást: leginkább az E_2 ($157,5 \pm 47,4\%$), majd a MPO ($127,8 \pm 39,9\%$), legkevésbé a kortizol ($121,7 \pm 52,3\%$). A kis elemszám miatt statisztikai analízist nem végeztünk, így csak tendenciákról tudunk beszélni az eredmények vizsgálatakor.

A kortikoszteron és kortizol gyökfogó hatásának vizsgálata

A hagyományos tápon tartott, kezeletlen kontroll csoportnál mért relatív lumineszcencia (RLU) nem változott a 28 napos vizsgálati idő alatt. A lipiddús diétás kontroll csoportnál a 28. napon magasabb volt a RLU, tehát rosszabb volt a gyökfogó kapacitás, mint a vizsgálat kezdetén, bár ez a különbség nem volt szignifikáns. A csökkent gyökfogó kapacitás a lipidterhelés által indukált oxidatív stressznek tulajdonítható. Mind a kortizollal ($0,076 \pm 0,037$ vs $0,11 \pm 0,021$), mind a kortikoszteronnal ($0,084 \pm 0,066$ vs $0,172 \pm 0,052$) kezelt csoportnál a 28. napon szignifikánsan alacsonyabb RLU-t, tehát jobb gyökfogó kapacitást mértünk, mint a 0. napon.

Az indometacin, ösztradiol és tesztoszteron hatásának vizsgálata patkány szepszis modellen

Az infekciót követően minden csoportban leverték, bágyadtak voltak az állatok, leginkább az indometacinnal kezelték (mind a fertőzöttek, mind a kontrollok).

A fehérvérsejtszám szignifikánsan magasabb volt az Ii csoportban, mint az I0 és Mi csoportokban. A I0 és Ii

csoporthoz képest. A CRP az Mi csoportban szignifikánsan magasabb volt, mint a többiben, és az Ii csoportban volt a legalacsonyabb.

A hormonkezelésben részesülő állatok esetében a fehérvérsejtszám az NT (nem kasztrált, tesztoszteronnal kezelt) csoportban alacsonyabb volt, mint az N0-ban (nem kasztrált kontroll), valamint a CT és CE csoportokban alacsonyabb volt, mint a kontroll C0 csoportban. A CT csoportban enyhe anaemiát észleltünk, itt a vörösvértest, hemoglobin és hematokrit szignifikánsan alacsonyabb volt a nem kasztrált csoportokéhoz (N0, NT) képest. A vérlemezkeszám a CE csoportban volt a legalacsonyabb, az NT és C0 csoportokhoz viszonyítva szignifikáns eltéréssel. A szérum fehérjék vonatkozásában nem volt szignifikáns eltérés a csoportok között, de minden csoportban alacsonyabb albumint mértünk, mint a nem fertőzött kontroll csoportban (M0). A CRP a CE csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt az összes többi csoporthoz képest. A CT csoportban is alacsonyabb

CRP-t mértünk, mint a C0-ban, de ez nem volt szignifikáns eltérés.

A szívvérből és májból reizolált *P. multocida* tenyészeteket vizsgálva az Ii csoport egyedeiből összességében több baktérium tenyésztett ki, mint az Mi csoportból: 11 mintából nőtt ki szőnyegszerű szintenyészet, és egy minta sem volt negatív. Ezzel szemben az Mi csoportban három minta adott szőnyegszerű tenyészetet, és három minta volt negatív.

Az NT csoportban kevesebb baktérium tenyésztett ki, mint a kontroll N0-ban. A kasztrált csoportok közül a CT csoportban több, a CE-ben kevesebb kórokozó nőtt ki, mint a C0-ban. A tesztoszteronnal kezelt csoportok közül a kasztrált CT-ből több baktériumot sikerült reizolálni, mint a nem kasztrált NT-ből. A kontroll (N0, C0) csoportok között nem volt ilyen különbség.

V. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatócsoportunk korábbi munkája során számos természetes szteroid hormonról kimutatta, hogy gátolja az aktivált neutrofil granulociták szuperoxid termelését. Ennek mechanizmusa nem teljesen ismert, de részben a MPO aktivitásának fokozásán, és a következményes negatív feedback-szerű NADPH-oxidáz gátláson keresztül valósul meg.

Munkánk során a szintetikus tibolon, valamint a kortizol és kortikoszteron antioxidáns hatását mértük. Ezt követően a MPO, az aktivitását fokozó hormonok és a MPO inhibitor indometacin neutrofil granulociták baktériumölő képességére és a szepszis kimenetelére való hatását vizsgáltuk.

Eredményeinket az alábbi fő pontokban foglalhatjuk össze:

1. Az ösztradiol és a tibolon egyes metabolitjai – 3β -tibolon-szulfát, 3β - 17β -tibolon-diszulfát és magasabb koncentrációban a 3β -hidroxitibolon és 3α -tibolon-szulfát is – csökkentik az aktivált izolált humán neutrofil granulociták szuperoxid termelését.

2. Az ösztradiol és a tibolon szulfatált metabolitjai (3α -tibolon-szulfát, 3α - 17β -tibolon-diszulfát, 3β -tibolon-szulfát, 3β - 17β -tibolon-diszulfát) csökkentik a xantin – xantin-oxidáz rendszer szuperoxid termelését. Ezek alapján feltételezhető, hogy a tibolonnak a posztmenopauzális medicinában ismert jótékony hatásai részben a gyökfogó kapacitásának köszönhetőek.

3. Lipiddús tápon tartott patkányok plazmájának teljes gyökfogó kapacitása csökken. A hosszú távú kortikoszteron ill. kortizol kezelés szignifikánsan javítja a gyökfogó kapacitást. A kortikoszteron és kortizol tehát antioxidáns hatású a vizsgálati körülmények között. Ennek, valamint egyéb szteroid hormonok ilyen hatásának ismeretében lehetőség nyílik az antioxidáns tulajdonság háttérben álló szerkezeti összefüggések vizsgálatára.

4. Az akut mieloperoxidáz, ösztradiol és kortizol kezelés javítja, az indometacin nem befolyásolja izolált humán neutrofil granulociták baktériumölő képességét.

5. Az indometacin kezelés és a kasztráció gyengíti a szeptikus patkányok immunválaszát és klinikai állapotát. Az indometacin feltehetőleg fokozza a bakteriális infekciók mortalitását.

6. Ezzel szemben a tesztoszteron, és még inkább az ösztradiol jótékony hatású szeptikus patkányokban. A tesztoszteronnal nem egyértelműek az eredmények, azonban az ösztradiol hatása kapcsán felmerülhet, hogy a rövid távú ösztrogén kezelést szeptikus állapotú betegek adjuváns terápiájának részeként vizsgálják. Ezt megelőzően azonban további, nagyobb elemszámú állatkísérletekre lenne szükség.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Stark J**, Tulassay Z, Lengyel G, Szombath D, Szekacs B, Adler I, Marczell I, Nagy-Repas P, Dinya E, Bekesi G (2013) Increased total scavenger capacity in rats fed corticosterone and cortisol on lipid-rich diet. *Acta Physiol Hung.* 100: 84-88. **IF: 0,747**
2. **Stark J**, Varga Z, Ghidán A, Vajdovich P, Szombath D, Marczell I, Várbíró S, Dinya E, Magyar T, Tulassay Z, Székács B, Nagy K, Rácz K, Békési G (2014) The effect of indomethacin, myeloperoxidase, and certain steroid hormones on bactericidal activity: an ex vivo and in vivo experimental study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 13: 27-35. **IF: 1,514 (2013)**
3. **Stark J**, Varbiro S, Sipos M, Tulassay Z, Sara L, Adler I, Dinya E, Magyar Z, Szekacs B, Marczell I, Kloosterboer HJ, Racz K, Bekesi G (2015) Antioxidant effect of the active metabolites of tibolone. *Gynecol Endocrinol.* 31: 31-35. **IF: 1,136 (2013)** *Megosztott elsőszerzős cikk.*

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

1. **Stark J**, Zágoni T, Tóth M, Gutaj P, Tulassay Zs (2010) A csontsűrűség vizsgálata irritábilis bél szindrómában. Magyar Belorvosi Archívum, 63: 443-448.
2. Marczell I, Tulassay Zs, Békési G, Tóth M, Patócs A, **Stark J**, Rácz K (2012) A sejtfelszíni szteroidreceptorok szerepe és azok klinikai vonatkozásai. Magyar Belorvosi Archívum, 65: 289-297.
3. Bekesi G, Tulassay Z, Lengyel G, Schaff Z, Szombath D, **Stark J**, Marczell I, Nagy-Repas P, Adler I, Dinya E, Racz K, Magyar K (2012) The effect of selegiline on total scavenger capacity and liver fat content: a preliminary study in an animal model. J Neural Transm. 119: 25-30. **IF: 3,052**
4. Adler I, Tulassay Z, **Stark J**, Marczell I, Nagy-Repas P, Varbiro S, Magyar Z, Szekacs B, Racz K, Bekesi G (2012) The effect of certain steroid hormones on the expression of genes involved in the metabolism of free radicals. Gynecol Endocrinol. 28: 912-6 **IF: 1,303**
5. Békési G., **Stark J.**: Endokrin betegségek időskorban. In: Tulassay Zs, Békési G, Rácz K (szerk.), A belgyógyászat alapjai fogorvosok számára. Medicina Kiadó, Budapest, 2014