

A rezveratrol sejtvédő hatásának és mechanizmusának tanulmányozása *in vitro* primer fibroaszt kultúrán

Tézisfüzet

Dr. Ulakcsai Zsófia Éva

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tábi Tamás, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Zupkó István, DSc, egyetemi docens
Dr. Köles László, PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szabó Dóra, DSc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Sára, PhD, egyetemi docens
Dr. Ducza Eszter, PhD, egyetemi docens

Budapest
2019

A rezveratrol sejtvédő hatásának és mechanizmusának
tanulmányozása *in vitro* primer fibroaszt kultúrán

Dr. Ulakcsai Zsófia Éva

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Budapest
2019

1. Bevezetés

A rezveratrol (3,5,4'-trihidroxi-szilbén) egy fitoalexin vegyület, mely számos növényben, de legnagyobb mértékben a kék szőlő héjában és magvaiban található meg. Előnyös farmakológiai hatásait jó néhány esetben leírták már, így többek között ismert öregedésgátló, antioxidáns, gyulladáscsökkentő, tumorellenes, neuroprotektív és kardioprotektív hatása is. Igazoltan hat az apoptózisra, viszont az ezzel kapcsolatos irodalom eléggé ellentmondásos, hiszen pro- és antiapoptotikus tulajdonságai egyaránt ismertek. Ezen különbségek a tanulmányokban abból adódhatnak, hogy a vegyület eltérő hatást fejthet ki kísérleti körülményektől, így például az alkalmazott dózistól, a kezelés hosszától vagy a vizsgált sejttípustól függően. Jellemzően, a rezveratrol ellentétes hatással bír az apoptózisra tumoros, illetve nem-transzformált sejtek esetében.

A rezveratrol célpontjai és hatásmechanizmusa még kevésbé tisztázottak. Az irodalmi források alapján hatással van különböző metabolikus és jelátviteli útvonalakra, van pro- és antioxidáns aktivitása is és számos transzkripciós faktor szabályzásában is részt vesz. A rezveratrol farmakológiai hatásaival gyakran összefüggésbe hozott receptorális támadáspontok az aromás szénhidrogén (AHR) és az ösztrogén receptorok. Sokrétű háttérmechanizmusai közül egyesek kiemelkedő jelentőséget tulajdonítanak a SIRT1 enzimnek, valamint hatásai hátterében számos más jelátviteli útvonal, így például a PI3-kináz/Akt, a p38 MAPK/JNK/ERK és az mTOR kináz útvonal szerepe is valószínűsíthető. A mitokondriális elektrontranszport-lánc és a szabadgyök (ROS) termelődés befolyásolását is gyakran felelőssé teszik a rezveratrol egyes farmakológiai hatásaiért. Mindemellett széles körben tanulmányozott a rezveratrol autofágiát befolyásoló hatása is.

2. Célkitűzések

Munkám célkitűzései a következők voltak:

1. A rezveratrol protektív hatásának igazolása káros stimulussal szemben, primer sejt kultúrán
 - A rezveratrol preventív hatásának igazolása egyidejűleg alkalmazott szérumbegvonás indukálta kaspáz-3 aktivációval szemben, primer egér embrionális fibroblaszt sejteken.
 - A rezveratrol kaspáz-3 aktivációt csökkentő hatásának igazolása három órás szérumbegvonást követően történő alkalmazással, primer egér embrionális fibroblaszt sejteken.

2. A rezveratrol szérumbegvonás indukálta kaspáz-3 aktivációra gyakorolt hatásának háttérben meghúzódó folyamatok megismerése
 - A p38, JNK, ERK, PI3K és mTOR kináz útvonalak, valamint a SIRT1 enzimet érintő jelátviteli út részvételének vizsgálata.
 - Az aromás szénhidrogén és ösztrogén receptorok szerepének vizsgálata.
 - A rezveratrol antioxidáns tulajdonságának tanulmányozása a kaspáz-3 aktivációra gyakorolt hatásával összefüggésben.
 - A mitokondriális depolarizáció és a reaktív oxigénradikálok szerepének megállapítása.
 - Az autofágia jelentőségének vizsgálata a rezveratrol kaspáz-3 aktivációra gyakorolt hatásában.

3. Módszerek

3.1 Az egyes tesztvegyületeket irodalmi adatok alapján meghatározott koncentrációban alkalmaztuk a kísérletek során. Az állatokat a Semmelweis Egyetem Állatkísérletes Etikai Bizottságának jóváhagyásával (22.1/606/001/2010, 2010. február 5.) és az Európai Tanács kísérleti és egyéb tudományos célokra felhasznált állatok védelmére vonatkozó rendelkezésének megfelelően kezeltük (86/609/EEC).

3.2 A vizsgálathoz nem-transzformált, primer embrionális egér fibroblasztokat használtunk melyet a CSH protokollnak megfelelően készítettünk. A sejteket 10%-os FBS tartalmú DMEM tápoldatban tenyésztettük, majd a kísérletekhez 3-7 passzázs között használtuk őket. Egy nappal a kezelés előtt a sejteket hat centiméteres petri-csészékbe raktuk ki (3×10^5 sejt/csésze) és másnap szérum-megvonást alkalmaztunk apoptózis kiváltása érdekében a rezveratrol, illetve a különböző jelátviteli útvonalak gátlószereinek jelenlétében, vagy hiányában. Az N-acetilcisztein, a benzo(a)pirén, a trimetoxiflavon, a tamoxifen, a fulvesztrant, az ösztadiol és a klorokin kezelés a szérum-megvonással és/vagy a rezveratrol kezeléssel egyidejűleg történt. A “mentő” hatás vizsgálatakor, három órás szérum-megvonást követően egészítettük ki rezveratrollal a sejt kultúra tápoldatot.

3.3 A kaszpáz aktivitás vizsgálatához, meghatározott (3, 4,5 és 6 órás) kezelési periódusokat követően a sejteket foszfát pufferes sóoldattal (PBS) mostuk és tripszin-EDTA oldattal szedtük fel. A citoszol kivonatot hipotóniás lízis puffer, majd 0,6% Nonidet P40 alkalmazásával készítettük. A rezveratrol direkt kaszpáz gátló hatásának vizsgálatára, a rezveratrolt a szérum-megvonásban részesült fibroblasztok citoszolkivonatához adtuk hozzá, közvetlenül a kaszpáz-3 aktivitás mérést megelőzően. A vizsgálathoz az Ac-VAD-CMK-t, egy nem-szelektív direkt kaszpáz inhibitor használtuk pozitív kontrollként, 20 μ M koncentrációban. A kaszpáz-3 aktivitást a kereskedelemben elérhető kittel mértük (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a gyártó utasítását követve, Fluoroskan Ascent FL Microplate spektrofluorométert (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) alkalmazva. A kaszpáz-3 aktivitást a minta Lowry módszere alapján meghatározott fehérje tartalmára normalizáltuk.

3.4 A fibroblaszt sejtek életképességét a laktát-dehidrogenáz (LDH) enzim felszabadulásának mérése által, a Promega cégtől vásárolt CytoTox-One[®] kit segítségével

vizsgáltuk. A mérést a kit leírásának megfelelően végeztük, a fluoreszcenciát 590 nm-en detektáltuk Fluoroskan Ascent FL Microplate spektrofluorométer segítségével, 530 nm-es gerjesztés mellett. Az adatok kiértékelése a kit leírásában javasolt módon történt.

3.5 A ROS termelődés tanulmányozására valamint a mitokondriális membránpotenciál változásának vizsgálatára a három órás kezelési periódust követően a fibroblaszt sejteket PBS-sel mostuk és tripszin-EDTA oldattal felszedtük, majd 1 μM HE-t, 2 μM DCFDA-t vagy 5 μM JC-1 festéket tartalmazó PBS-ben reszuszpendáltuk. 37 °C-on történő 30 perces inkubációt követően a sejtuszpenziót lecentrifugáltuk (450g, 5 perc, szobahő), PBS-sel mostuk és Fluoroskan Ascent FL Microplate spektrofluorométer segítségével a minták fluoreszcenciáját a következő hullámhosszakon detektáltuk: DCFDA – 485 nm (gerjesztés)/538 nm (emisszió), HE – 530 nm (gerjesztés)/590 nm (emisszió), JC-1 – 485 nm (gerjesztés)/538 nm (emisszió) és 485 nm (gerjesztés)/590 nm (emisszió). A mitokondriális membránpotenciál depolarizációjának mértékét a zöld/piros emisszióintenzitás-arány segítségével adtuk meg.

3.6 A sejtben lévő savas sejtalkotók akridin-narancs festéssel történő tanulmányozása érdekében a sejteket egy 24 lyukú szövettenyésztő lemez egy-egy edényébe elhelyezett kerek üveg fedőlemezre növesztettük, majd három órás szérum-megvonást alkalmaztunk 200 μM rezveratrol jelenlétében illetve hiányában. A kezelési idő lejártával a sejteket PBS-sel mostuk és PBS-ben hígított 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ koncentrációjú akridin-narancssal festettük 15 percig 37 °C-on. Az inkubációt követően a fedőlemezeket PBS-sel mostuk és a sejtekről fluoreszcens felvételeket készítettünk epifluoreszcens mikroszkóp (Olympus Corporation, Tokio, Japán) segítségével.

3.7 A Western-blot analízishez a kezelt és kezeletlen fibroblaszt sejt kultúrákból teljes sejt-lizátumot készítettünk. Ehhez RIPA puffert használtunk. A minták teljes fehérjetartalmát a Bradford módszer segítségével határoztuk meg. A lizátumhoz Lemmli puffert adtunk és a mintát 5 percen keresztül 95°C-on tartva, denaturáltuk azt, majd 30 μg fehérjét vittünk fel az egyes zsebekbe. A mintákat 15% SDS-poliakrilamid gélen futtattuk. Az elválasztás után a fehérjéket PVDF membránra vittük át. A membránhoz kötődött fehérjéket 0,1% Tween 20-at tartalmazó TRIS-szel puffereelt sóoldatban (TBST) oldott 2% sovány tejpórral vagy 5%

BSA-val blokkoltuk egy óráig. A primer antitesteket (LC3 A/B, p62, GAPDH) egy éjszakán át hagytuk a membránon (4°C). Másnap a membránokat TBST-vel mostuk háromszor 10 percre, ezt követően tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel (nyúl és egér IgG) inkubáltuk egy órán át, szobahőmérsékleten. Az immunreaktív sávokat, vagyis a specifikus fehérjéket kemilumineszcens módon, röntgenfilmen tettük láthatóvá Pierce ECL Western Blot reagenst alkalmazva. A fehérjeexpresszió kvantifikálásához denzitometriás analízist végeztünk az Image J szoftver segítségével (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Az eredmények kiértékelésénél az LC3-II/LC3-I denzitárányt alkalmaztuk, illetve a p62-specifikus sávok optikai denzitását mindig ugyanazon minták GAPDH-specifikus sávjaira normalizáltuk.

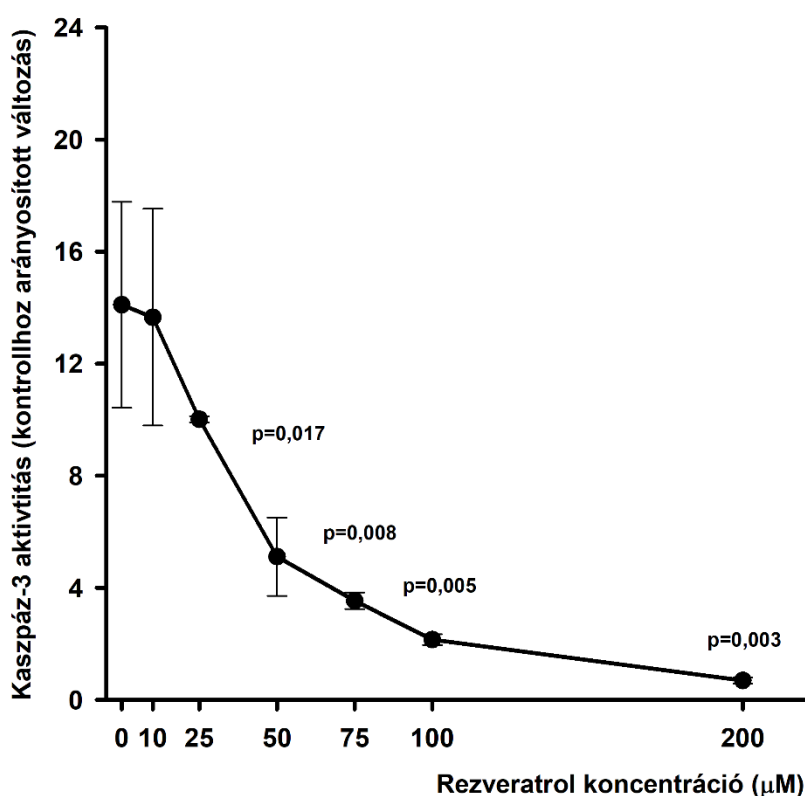
3.8 Az értekezésben szereplő adatokat rendre átlag \pm szórás formában adtuk meg minimum három párhuzamos mérés eredményei alapján. Az eredményeket a kontrollhoz viszonyított növekedésként ábrázoltuk. A statisztikai különbségek kiértékeléséhez kétmintás t-próbát vagy többszörös összehasonlítások esetén egyszempontos ANOVA-t alkalmaztunk. ANOVA esetén az egyes csoportok közötti szignifikancia meghatározását Sidac-féle *post hoc* teszt segítségével végeztük. Egy különbséget akkor tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak, ha a p értéke kisebb volt, mint 0,05. Az egyes kísérleteket egyenként legalább háromszor megismételtük. Az ábrák az összes elvégzett kísérlet eredményeinek átlagát reprezentálják.

4. Eredmények

4.1 Primer egér fibroblasztokon a szérum-megvonás már három-hat óra alatt nagymértékű kaszpáz-3 aktivációt eredményezett ($P < 0,001$). A rezveratrol védő hatásának értékeléséhez szérum-megvonással egyidejűleg a sejteket a vegyület különböző koncentrációival (10, 25, 50, 75, 100, 200 μM) kezeltük. A rezveratrol dózisfüggően gátolta a kaszpáz-3 aktivációt $66,3 \pm 13,81 \mu\text{M}$ -os IC_{50} értékkel. Teljes mértékű kaszpáz-3 gátlást három óra szérum-megvonást követően 200 μM -os rezveratrol koncentrációval értünk el, így a további kísérletekhez ezt a koncentrációt használtuk (1. ábra). A védő hatás még hat óra szérum-megvonás után is megfigyelhető volt. Mivel a szérum-megvonás által kiváltott kaszpáz-3

aktiváció és a rezveratrol védő hatása már három óra szérumszivonást követően is szignifikáns volt, a további kísérletek során a három órás szivonást alkalmaztuk a kaszpáz-3 aktiváció kiváltására.

A rezveratrol direkt kaszpáz gátló hatásának vizsgálatára, a rezveratrolt nem a sejt kultúra tápoldathoz adtuk hozzá, hanem közvetlenül a szérumszivonásban részesült fibroblasztok citoszol kivonatahoz. A rezveratrol ezen körülmények között direkt kaszpáz gátló hatást nem mutatott.



1. ábra: A rezveratrol hatása a szérumszivonás-indukált kaszpáz-3 aktivációra. A rezveratrol dózisfüggően gátolta a kaszpáz-3 aktivációt három óra szérumszivonást követően. A kaszpáz-3 aktivitás kontroll értéke szérumszivonás nélkül: $1,76 \pm 0,097$ nmol/mg/három óra. A p értékek a rezveratrollal nem kezelt, szérumszivonás csoportéhoz történt hasonlításra vonatkoznak.

4.2 Megvizsgáltuk, hogy a rezveratrol képes-e a már aktiválódott kaszpáz-3 aktivitást csökkenteni. Három órás szérumszűrés követően a primer fibroblasztok tápoldatát 200 μM -os rezveratrollal egészítettük ki és további két óra várakozás után megmértük a kaszpáz-3 aktiváció mértékét. A rezveratrol ekkor is jelentősen csökkentette a kaszpáz-3 aktivitást. A vegyület nemcsak a további kaszpáz aktivációt akadályozta meg, de a kezdeti három óra szérumszűrés után mért kaszpáz-3 aktivitást is tovább csökkentette. A kísérlet eredménye alapján feltételezhetjük, hogy a rezveratrol nem kizárólag védő, hanem mentő hatással is rendelkezhet.

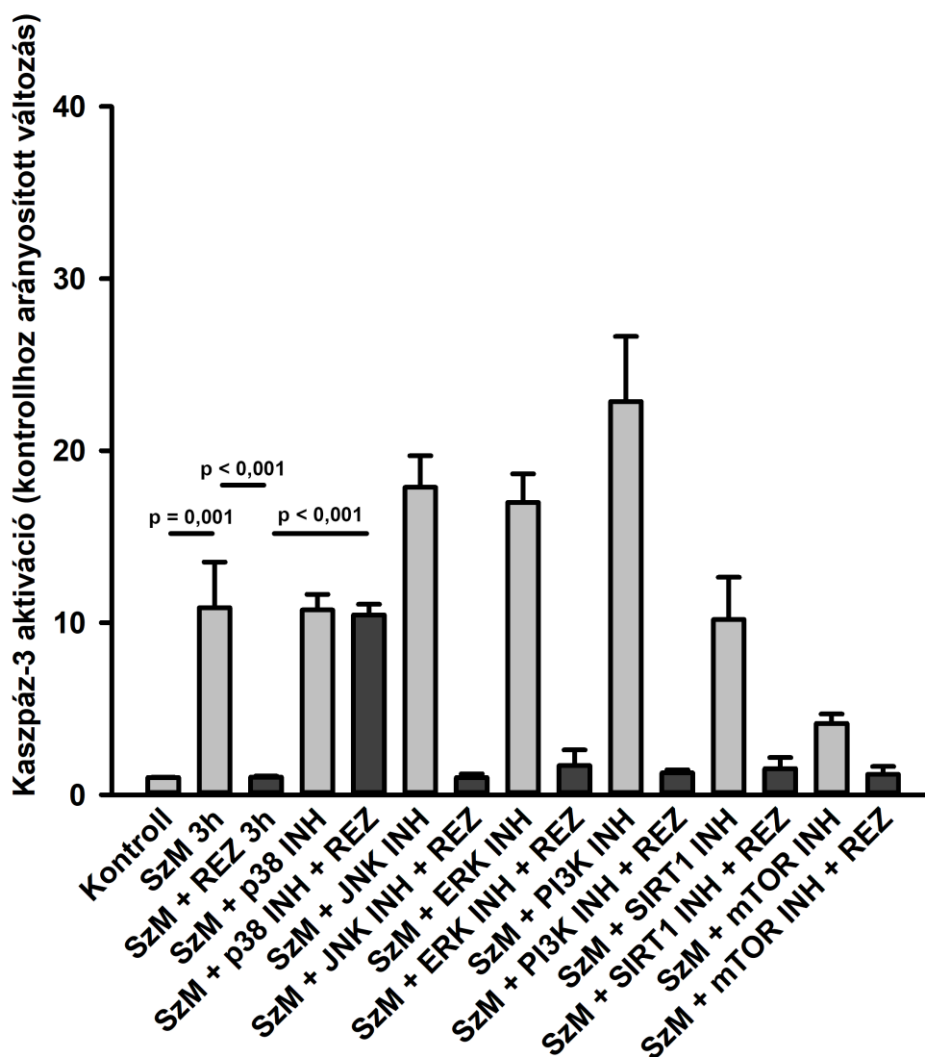
4.3 A fibroblasztsejtek életképességének vizsgálatára a laktát-dehidrogenáz enzim kibocsátás mértékének meghatározását alkalmaztuk, hogy megtudjuk a rezveratrol kaszpáz-3 gátló hatása együtt jár-e a sejtek életképességének javulásával. Az eredmények azt mutatták, hogy 24 óra szérumszűrés követően csökkent a sejtek életképessége, melyet egyidejű 200 μM rezveratrol kezelés jelentősen mérsékelte.

4.4 Annak érdekében, hogy kiderítsük milyen jelátviteli útvonal játszik fontos szerepet a rezveratrol hatásában, p38, JNK, ERK, PI3K, mTOR kináz útvonalak és SIRT1 gátlószer jelenlétében megvizsgáltuk, hogy változik-e a rezveratrol hatására a kaszpáz-3 aktiváció mértéke. Az eredményeink alapján, az említett gátlószer közül kizárólag a p38 MAPK gátlószer, a SB 202190 szüntette meg a rezveratrol védő, kaszpáz-3 aktivációt gátló hatását (2. ábra).

4.5 A rezveratrol protektív hatásában feltételezhetően szerepet játszó receptorok felderítése érdekében kísérleteket végeztünk a specifikus AHR agonista benzo(a)pirén és az AHR antagonistá trimetoxiflavon jelenlétében. A vegyületek a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációra gyakorolt preventív hatását csak elhanyagolható mértékben befolyásolták.

4.6 Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy az ösztrogén receptornak szerepe van-e a rezveratrol protektív hatásában, először az egyik leggyakrabban alkalmazott antiösztrogén vegyülettel, a tamoxifennel végeztünk kísérleteket. A mért adatok alapján, a tamoxifen nem befolyásolta a rezveratrol citoprotektív hatását, habár rezveratrol hiányában, a tamoxifen önmagában erőteljes preventív hatást mutatott a szérumszűrés indukálta kaszpáz-3

aktivációval szemben. Tovább vizsgálva az ösztrogén receptor szerepét azt találtuk, hogy a tamoxifennél szelektívebb, tiszta ösztrogén receptor antagonistául fulvesztrant és az agonista ösztradiol egymáshoz hasonlóan viselkedtek, nevezetesen mindkét vegyület szignifikáns mértékben potenciózta a szérum-megvonást követő kaszpáz-3 aktivációt, de egyik sem befolyásolta jelentős mértékben a rezveratrol protektív hatását.

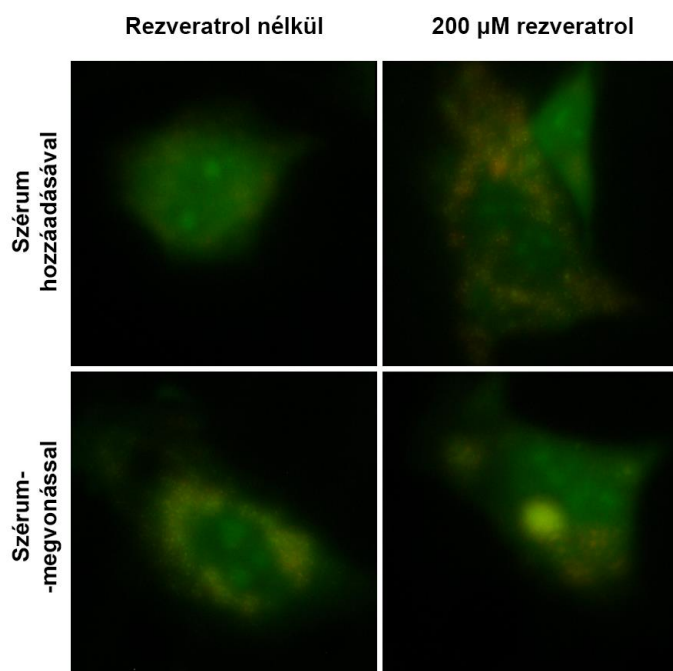


2. ábra: Kétszáz μM rezveratrol (REZ) hatása a három órás szérum-megvonás (SzM) indukálta kaszpáz-3 aktivációra a p38, JNK, ERK, PI3K, mTOR és SIRT1 útvonalak gátlószereinek jelenlétében.

4.7 Tekintve, hogy a p38 kináz útvonal elsősorban intracelluláris stressz hatására aktiválódik, és a rezveratrol pro- és antioxidáns tulajdonságát is leírták már, úgy gondoltuk, hogy a ROS képződésnek szerepe lehet a szérumsugárzás-indukált kaspáz-3 aktivációnak és/vagy a rezveratrol védő hatásának kialakulásában. Annak tisztázására, hogy a rezveratrol sejtvédő hatása az antioxidáns tulajdonságának köszönhető-e, megvizsgáltuk a jól ismert antioxidáns, az N-acetilcisztein hatását a szérumsugárzást követő kaspáz-3 aktivációban. Várakozásainkkal ellentétben a szérumsugárzás miatt bekövetkező kaspáz-3 aktiváció az N-acetilcisztein hatására nem csökkent, sőt még növekedett is a mértéke. Ugyanakkor, a rezveratrol képes volt az így megnövekedett kaspáz-3 aktiváció kivédésére is.

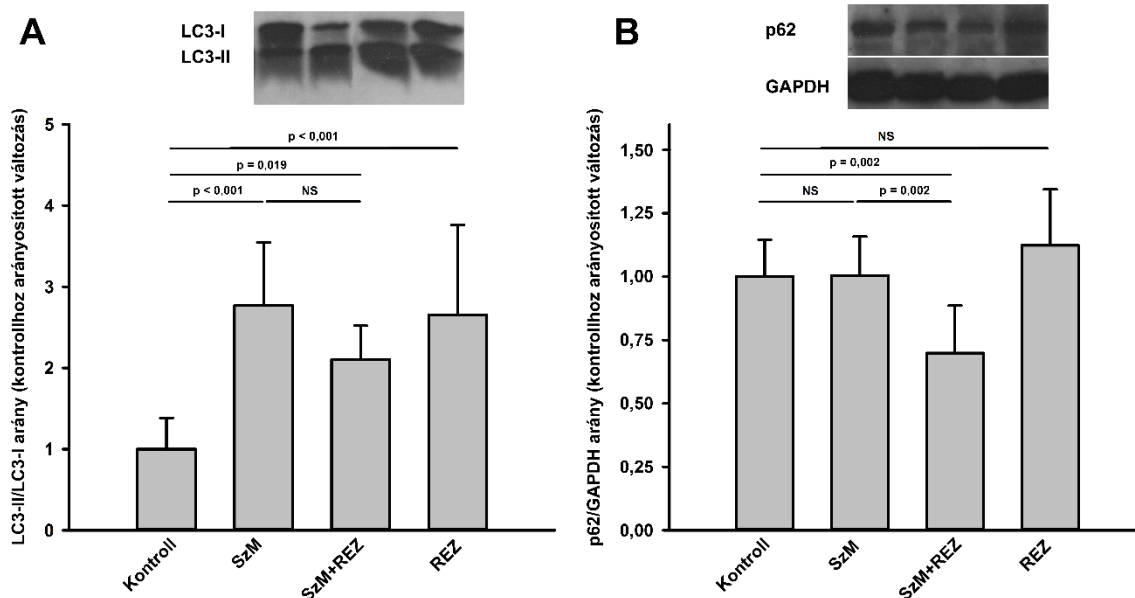
4.8 A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a mitokondriális membránpotenciál változása és a reaktív oxigén származékok (ROS) termelődése szerepet játszik-e a rezveratrol hatásmechanizmusában. Mérési eredményeink alapján a szérumsugárzás nem befolyásolta jelentősen a mitokondriális membránpotenciált, és önmagában a rezveratrol is csak csekély mértékű membrán depolarizációt okozott a szérummal ellátott sejtekben. Ezzel ellentétben, szérumsugárzás jelenlétében a rezveratrol szignifikánsan csökkentette a mitokondriális membránpotenciál mértékét. Sem a szérumsugárzás, sem a rezveratrol, sem ezek kombinációja nem módosította jelentős mértékben a ROS termelődés mértékét.

4.9 Mivel korábban már összefüggésbe hozták a rezveratrol bizonyos hatásait autofágia indukáló tulajdonságával, a továbbiakban arra kerestünk választ, hogy a vegyület sejtvédő hatása is összefüggésbe hozható-e ezen tulajdonsággal. A savas sejtalkotók akridin-narancs festéssel történő tanulmányozása során azt tapasztaltuk, hogy már önmagában a szérumsugárzás és a rezveratrol kezelés, illetve ezek kombinációja is növelte a savas vakuólumok számát, mely az autofagoszómák fokozott képződésére utalt (3. ábra).



3. ábra: A rezveratrol hatása az autofágiára. A szérum-megvonás, a 200 μ M rezveratrol és kombinációjuk hatása a savas vakuólumok képződésére. A sárgás-narancs pöttyök a citoplazmában a savas vakuólumokat reprezentálják.

Az autofágia szerepének további vizsgálatához, a jól ismert autofágia inhibitor vegyületet, a klorokint alkalmaztuk, mely teljes mértékben meggátolta a rezveratrol protektív hatásának megjelenését. Sőt mi több, a szérum-megvonás indukálta kaspáz-3 aktiváció még tovább fokozódott, mikor a rezveratrolt és a klorokint egyidejűleg alkalmaztuk. A klorokin kezelés önmagában ugyanakkor nem befolyásolta a szérum-megvonás által kiváltott kaspáz-3 aktivációt. Ezt követően az LC3 és p62 fehérjék, az autofágia korai és kései markereinek expresszióját tanulmányoztuk Western blot technikával. Azt tapasztaltuk, hogy az LC3-II/LC3-I fehérje expressziós arány szignifikánsan megnőtt a szérum-megvonás hatására, melyet a kiegészítő rezveratrol kezelés már nem változtatott meg jelentősen. A szérum-megvonás önmagában nem befolyásolta a p62 fehérje szintjét, de rezveratrol kezelés hatására nagymértékben fokozódott a p62 fehérje degradáció a szérum-megvonásban részesült sejtekben, mely az autofágiás fluxus növekedésére enged következtetni (4. ábra).



4. ábra: A rezveratrol hatása az autofágiára. Az autofágia marker proteinek expressziója. A szérum-megvonás (SzM), a 200 μ M rezveratrol (REZ) és kombinációjuk hatása az LC3-II/LC3-I arányra [A] és a p62 protein degradációjára [B].

5. Következtetések

5.1 A rezveratrol hatásosnak bizonyult a szérum-megvonás indukálta kaspáz-3 aktiváció gátlására primer embrionális egér fibroblaszt sejteken és növelte a sejtek életképességét is. A jelen kísérletekben 200 μ M-os rezveratrol koncentrációval sikerült a legnagyobb mértékű citoprotektív hatást kiváltani. Kísérleteinkben a rezveratrolt a szérum-megvonással egyidejűleg adtuk a sejtek tápoldatához és így igazoltuk a vegyület sejtvédő tulajdonságát. Mindemellett igazoltuk azt is, hogy ha a rezveratrolt utólag, már három óra szérum-megvonást követően adtuk a sejtekhez, a vegyület mintegy utólagos kezelésként is képes volt mérsékelni a már megemelkedett kaspáz-3 aktivitást. Feltételezhető tehát, hogy a rezveratrol nem kizárólag védő, hanem mentő hatással is rendelkezik a fokozott kaspáz-3 aktivitás tekintetében, mely tulajdonságát, legjobb tudomásunk szerint, elsőként mi közöltük.

5.2 A rezveratrol különböző farmakológiai hatásai háttérében számos jelátviteli útvonal szerepe valószínűsíthető. A PI3-kináz/Akt, a p38 MAPK/JNK/ERK jelátvitel, az mTOR és a SIRT1-et érintő útvonalak mind szerepet játszhatnak a rezveratrol citoprotektív hatásában. Kísérleteink eredményei alapján a fenti jelátviteli útvonalak közül a p38 kináz szerepe igazolódott be a rezveratrol szérum-megvonást követő kaszpáz-3 aktiváció kivédésében. Jóllehet az irodalmi adatok alapján a rezveratrol p38 kinázra kifejtett hatásai meglehetősen ellentmondásosak. A p38 kináz vélhetően kettős szereppel bír a sejt sorsát illetően, a sejt túléléseért és haláláért is felelhet, mely függhet a vizsgált sejtípustól, a stimulus típusától és a p38 izoformától is. Ezzel összefüggésben kimutattuk, hogy a fent leírt kísérleti körülmények között a p38 kináz inkább egy citoprotektív, mintsem proapoptotikus hatás kiváltásában játszott szerepet.

5.3 A rezveratrol bizonyos hatásai kapcsolatba hozhatók az AHR-hoz való kötődésével. Jelen kísérletben, az AHR agonista és antagonistá vegyületek a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációban gyakorolt preventív hatását csak elhanyagolható mértékben befolyásolták, így valószínűsíthető, hogy a vegyület protektív hatása független az AHR-ok aktivációjától vagy gátlásától.

5.4 A rezveratrolt gyakran azonosítják úgy, mint egy ösztrogén-receptor modulátor vegyületet és számos farmakológiai hatást tulajdonítanak ezen sajátjának, bár az erre vonatkozó irodalmi adatok és elképzelések nem egységesek. Molekuladinamikai szimulációkkal rávilágítottak arra, hogy a rezveratrol sokkal inkább egy szelektív ösztrogén-receptor modulátorként viselkedik és a tényleges hatása nagyban függ a celluláris környezettől és egyéb ko-regulátor proteinek jelenlététől. Az általunk végzett vizsgálatokban a tamoxifen nem befolyásolta a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációra kifejtett hatását, sőt a rezveratrolhoz hasonlóan képes volt kivédeni a szérum-megvonás indukálta kaszpáz aktivációt. Az ösztrogén-receptoroknak a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációt kivédő hatásában betöltött lehetséges szerepének tisztázása érdekében a tiszta ösztrogén-receptor antagonistá fulvesztrant és agonista ösztradiol vegyületekkel is vizsgálatokat végeztünk. Eredményeink azt sugallják, hogy a rezveratrol a kaszpáz aktivációt kivédő hatását az ösztrogén-receptoroktól függetlenül fejt ki.

5.5 A rezveratrol antioxidáns és prooxidáns tulajdonságait is leírták már. A szakirodalom felveti annak a lehetőségét, hogy az, hogy a rezveratrol antioxidáns vagy prooxidáns tulajdonsága érvényesül a különböző hatásai kapcsán, az nagymértékben függ a rezveratrol dózisától, a kezelés hosszától és a celluláris redox státusztól. Lényegében tehát, a rezveratrol hatása különbözhet attól függően, hogy a celluláris stressz jelen van-e a vizsgálati körülmények között. Jóllehet, számos közlemény számolt be arról, hogy a rezveratrol sejtvédő hatása az antioxidáns tulajdonságának köszönhető, vizsgálatainkban a szintén antioxidáns tulajdonságú N-acetilcisztein nem csökkentette, hanem növelte a szérumbegvonás által indukált kaszpáz aktivációt és ezt a hatást a rezveratrol kezelés megszüntette. Megállapíthatjuk tehát, hogy az N-acetilcisztein, antioxidáns tulajdonsága ellenére nem rendelkezik protektív hatással a szérumbegvonás indukálta kaszpáz-3 aktivációval szemben és nem befolyásolja a rezveratrol kedvező hatását. Mindezek alapján pedig az a következtetés vonható le, hogy a rezveratrol antioxidáns tulajdonsága önmagában nem lehet elég a protektív hatáshoz, egymagában nem lehet magyarázata a sejtvédő hatásának.

5.6 Korábbi vizsgálataink azt igazolták, hogy a rezveratrol szérumbegvonás okozta kaszpáz-3 aktivációt kivédő hatásában a p38 MAPK stressz kináz kritikus szerepet játszik, ezért megvizsgáltuk a mitokondriális diszfunkció és a ROS termelés szerepét, mint a celluláris stressz lehetséges forrásait a rezveratrol citoprotektív hatásában. Azt találtuk, hogy sem önmagában a szérumbegvonás, sem a rezveratrol nem befolyásolták a mitokondriális membránpotenciált, viszont együttes alkalmazásuk esetén a rezveratrol szignifikáns mitokondriális depolarizációt okozott a szérumbegvonásban részesült sejtekben. Eredményeink összhangban állnak azzal a korábban közölt megállapítással, miszerint a rezveratrol a mitokondriális légzési lánc funkciójára is hatással van. Jóllehet, a mitokondriális diszfunkcióra úgy tekintenek, mint a ROS képződés legfőbb forrására, az értekezésben bemutatott kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy sem a szérumbegvonás, sem a rezveratrol kezelés, továbbá a kettő kombinációja sem okozott szignifikáns változást a ROS termelésben, a kimutatott mitokondriális membrán depolarizáció ellenére sem. Eredményeinket magyarázhatja egy ellensúlyozó mechanizmus, nevezetesen a vegyület direkt antioxidáns hatása, ami kompenzálja a mitokondriális károsodás által kiváltott ROS

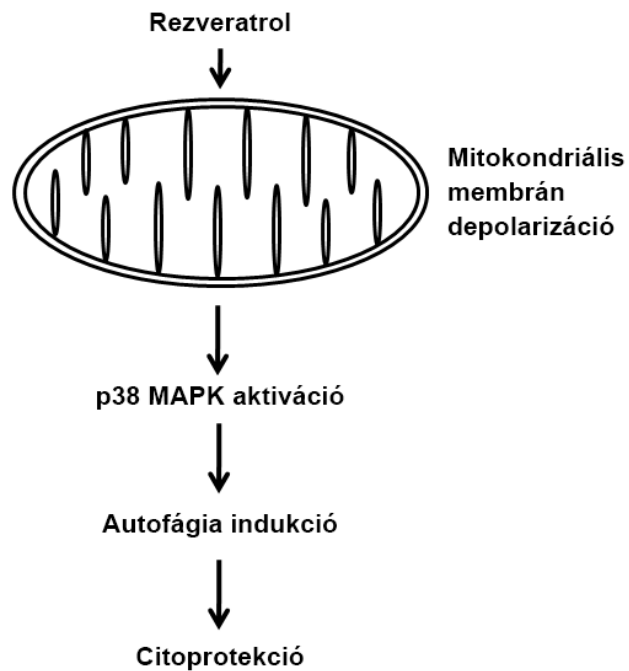
képződést. Lehetséges, hogy a kompenzáló mechanizmus révén a rezveratrol által indukált intracelluláris stressz egy olyan alacsony tartományban tartható, ami már képes bizonyos citoprotektív folyamatok aktiválására, mint például az autofágia, anélkül, hogy direkt celluláris károsodást okozna. Ez a folyamat az iszkémiás prekondicionálás hatására emlékeztethet, hiszen a rezveratrol egy enyhe károsodást okozva növeli a sejtek stressztűrő képességét. Ezt az elképzelést látszik alátámasztani az a megfigyelés is, hogy különböző szignál transzdukciós útvonalak, többek között a rezveratrol protektív hatásában vizsgálataink alapján kritikus szerepet játszó p38 kináz útvonal is részt vesz a prekondicionálás molekuláris mechanizmusában.

5.7 A mitokondriális membrán depolarizációt és a p38 kináz útvonal aktivációját gyakran összefüggésbe hozzák az autofágia jelenségével. Továbbá, mind a kísérleteinkben a rezveratrolhoz hasonlóan viselkedő tamoxifenről, mind magáról a rezveratrolról is számos alkalommal leírták már, hogy befolyásolni képesek az autofágiát. Mindezek alapján megvizsgáltuk, hogy szerepe lehet-e az autofágiának a rezveratrol szérum-megvonás indukálta kaszpáz-3 aktivációt kivédő hatásában. Az autofágia alkalmas citoprotektív hatás közvetítésére és a károsodott sejtorganellumok eliminálása révén erősíteni tudja a sejtek stressztűrő képességét. Kísérleteinkben az autofágia kései fázisát gátló klorokin jelenlétében teljes mértékben megszűnt a rezveratrol gátló hatása a szérum-megvonás okozta kaszpáz aktivációval szemben, mely az autofágia fontosságára utal a rezveratrol citoprotektív funkciójában. Ráadásul, a klorokin nemcsak hogy megszüntette, de átfordította a rezveratrol védő hatását a kaszpáz-3 aktivációval szemben, hiszen a rezveratrollal és szérum-megvonással egyidejűleg alkalmazott klorokin kezelés esetén magasabb szintű kaszpáz aktiváció volt tapasztalható, mint az önmagában alkalmazott szérum-megvonás esetén. Rezveratrol nélkül a klorokin ugyanakkor sem önmagában, sem a szérum-megvonással együtt nem befolyásolta jelentősen a kaszpáz-3 aktiváció mértékét. Ez arra utal, hogy autofágia hiányában a rezveratrol protektív hatása valószínűleg átfordul egy inkább károsító irányba, ami összhangban áll a feltételezett prekondicionálás-szerű mechanizmussal.

Az autofágia részvételét a rezveratrol sejtvédő hatásában sikerült megerősítenünk az LC3 és a p62 proteinek mennyiségének meghatározása során is, melyek az autofágia korai és késői

szakaszának legfőbb markerei. A kísérleti eredményeink azt mutatták, hogy a szérumszűrés önmagában is fokozta az autofagoszóma képződést, de mindezt nem kísérte az autofágiás fluxus növekedése. A rezveratrol szérumszűrés jelenlétében ez utóbbi folyamatot befolyásolta, melyet a p62 megnövekedett degradációja jelzett. Mindez arra utal, hogy a rezveratrol az autofágia kései fázisát fokozza és ez vezethet citoprotektív hatásához. Feltételezhetjük tehát, hogy a szérumszűrés következményeként fokozódó autofágia egy ellenregulációs mechanizmusként funkcionál, melynek célja a károsodások eliminációja, de ez valószínűleg mégsem elegendő ahhoz, hogy az apoptotikus folyamaton felülkerekedjen. Az autofágia további facilitációja tehát feltehetőleg citoprotektív hatást válthat ki, az apoptózis aktiváció ellensúlyozása által. A rezveratrol elképzelhető, hogy ilyen módon, az autofágiás fluxus facilitációja révén képes erősíteni a citoprotektív mechanizmus hatását.

5.8 A hatásmechanizmus vizsgálata alapján tehát feltételezhetjük, hogy a rezveratrol a szérumszűrésben részesült primer fibroblaszt sejtekben enyhe mitokondriális károsodást és ezáltal intracelluláris stresszt okozva, egy p38-függő útvonalon keresztül autofágiát indukál, mely a károsodott, diszfunkcionális sejtalkotók eliminálása révén megvédi a sejteket az apoptózistól. Ez a hipotézis magyarázatul szolgálhat egyes, a rezveratrol pro- és antiapoptotikus hatásaival kapcsolatos ellentmondásra is. Elképzelhető, hogy a rezveratrol elsődlegesen egy enyhe károsodást okoz a sejtben, ami egyaránt eredményezheti különböző stresszrezisztencia útvonalak potenciózását vagy direkt citotoxikus hatást, az aktuális kísérleti körülményektől, így például az alkalmazott dózistól, a vizsgált sejtípustól, a károsító behatás intenzitásától vagy a mitokondriális redox státusztól függően (5. ábra).



5. ábra: A rezveratrol szérum-megvonás indukálta kaszpáz-3 aktivációt kivédő hatása mögött feltételezett mechanizmus összefoglalása. Az elméletünk szerint, a rezveratrol enyhe mitokondrium károsodást és ezáltal intracelluláris stresszt okoz. Ez az intracelluláris stressz azonban feltételezhetően a rezveratrol direkt antioxidáns hatása révén egy olyan alacsony tartományban marad, ami már képes bizonyos citoprotektív folyamatok aktiválására, mint például az autofágia, anélkül, hogy direkt celluláris károsodást okozna. Feltételezzük, hogy a rezveratrol által kiváltott enyhe intracelluláris stressz hatására a p38 MAPK útvonal aktiválódik, ami képes autofágiát indukálva citoprotektív hatást kiváltani.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

Ulakcsai Z, Bagaméry F, Vincze I, Szökő É, Tábi T.

Protective effect of resveratrol against caspase 3 activation in primary mouse fibroblasts.

CROATIAN MEDICAL JOURNAL. 2015 Apr;56(2):78-84.

Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos

IF: 1,483

Ulakcsai Z, Bagaméry F, Szökő É, Tábi T.

The role of autophagy induction in the mechanism of cytoprotective effect of resveratrol.

EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES. 2018 Oct 15;123:135-142.

Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos

IF: 3,466 (2017)

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Tábi Tamás Egyetemi Docens Úrnak**, aki folyamatosan támogatott és tanácsaival, gyakorlati útmutatásával irányította és kitartóan segítette kutatói munkámat.

Köszönettel tartozom **Dr. Bagdy György Professor Úrnak** a Gyógyszerhatástani Intézet Igazgatójának, hogy az intézetben végzett kutatómunkámat lehetővé tette.

Továbbá köszönettel tartozom **Dr. Szökő Éva Professor Asszonynak**, a kutatói munkám során nyújtott szakmai segítségéért, támogatásáért.

Szeretném megköszönni **Dr. Bagaméry Fruzsina Kolléganőmnek** a kísérleti munka során nyújtott gyakorlati segítségét, együttműködését.

Szeretnék köszönetet mondani a **Gyógyszerhatástani Intézet munkatársainak** a segítségükért, mely által munkámat színvonalas szakmai környezetben végezhettem.

Köszönettel tartozom továbbá családomnak, akik munkám alatt végig támogattak és biztos hátteret nyújtottak tudományos munkámhoz és e dolgozat létrejöttéhez.