

A transz-rezveratrol és rokonvegyületek vizsgálata BioAréna-rendszerben

Részletes zárójelentés

Bevezetés

A múlt század 90-es éveitől – az un. **Francia ellentmondás** felismerése után, ami szerint Dél-Franciaországban pl. a zsiros táplálkozás ellenére jelentősen kisebb a szívkoszorúér megbetegedésben szenvedők, ill. elhunytak száma, mint Európa más országaiban vagy az Egyesült Államokban – egyre növekvő intenzitással foglalkoznak az egész világon egyrészt magával a **vörös bor biológiai hatásaival**, de a vörös bor készítés, tárolás stb. szempontjaival is, valamint a **hatásért leginkább felelős sztilbén származék, a transz-rezveratrol (TR) legkülönbözőbb célú vizsgálatával** [1,2].

Mindenesetre ez a felismerés a kékszőlővel és a vörösborral, majd a TR-rel, mint az egyik tényleges hatóanyaggal, új helyzetet teremtett nagyon sok szempontból is mind a táplálkozás és a betegség (megelőzés) ellenállóság, mind néhány alapvető biokémiai reakciót [pl. **formaldehid (HCHO) ciklus** és az élővilág témában] illetően.

Ma már a világ legkülönbözőbb kutatócsoportjaiban a TR kedvező biológiai hatásainak sokaságát irták le, amiből **csupán néhány jellemző példát mutat** be az 1. ábra. Ez az ábra azt is mutatja azonban, hogy ez a **hatásrendszerezés nagyon aktuális volt már**, amit egyébként mi tettünk meg először [3,4], (az átmeneti hatások főleg a rák különböző formáit illetik, de csak erősítik a felosztás indokoltságát, hiszen a TR a kémiai karcinogenezis mind a három fő fázisában hatékony [5], akár szét is lehetett volna “osztani”, de így meggyőzőbb az..). E mögé a hatáscsoportosítás mögé kellett megfelelő kémiai reakciósort állítani, aminek segítségével sikerült eljutni a TR kettős (kétlépéses) biológiai hatásához, aminek elemeit a 2. ábra szemlélteti.

A	B
Kémiai védőhatások	Gátló/ölő hatások
szívvédő [6]	gombagátló [11]
antiplatelet [7]	baktériumgátló [12]
antimutagén [8]	virusellenes [13]
antiallergiás [9]	apoptotikus [14,15]
anti-amiloidogén [10]	természetes peszticid [16]

C

Kémiai védő és gátló/ölő hatások
anticarcinogén(iniciálás, promoció, progresszió) [5,17]
szelektív antileukémiás hatás [18]

1. ábra A TR biológiai hatásainak rendszerezése

1. lépés	2. lépés
elvonás/gyűjtés (HCHO) Kémiai védelem	új (hidroximetil) származékok hatása Gátló/ölő hatás

2. ábra A transz-rezveratrol kettős (kétlépéses) hatásának elemei

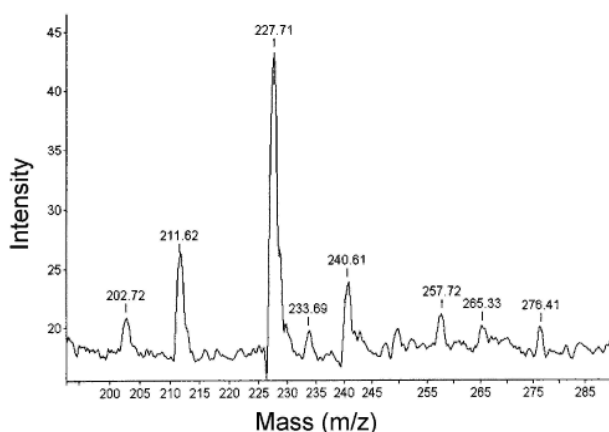
Ezen megfontolások alapján terveztük és hajtottuk végre vizsgálatainkat a jelen projekt keretében is.

A TR és a HCHO közötti reakció tanulmányozása modell kísérletekben s a mikrokémiai reakciókat jelentő BioAréna-rendszerben

Kémiai modell kísérletek

Korábbi előzetes kísérleteink alapján [19] szisztematikus vizsgálatokat végeztünk a TR és rokonvegyületei (pl. a TR-nél egy OH-csoporttal többlet hordozó sztilbén-származék, a **piceatannol**) és a hígított formalin oldat között. Megállapítottuk, hogy a **TR reakcióba lép a HCHO-val**, s különböző hidroximetil-származékok és más vegyületek képződnek. A 366 nm-nél, UV lámpa alatt citromsárga és narancssárga színű , **modell kísérletben megfigyelt származékokat a TR és az állati szövetek közötti reakció** (pl. sertésmáj és sertésszív szövetek) esetében is megfigyeltünk. A reakciótermékeket kromatográfiás (TLC, OPLC, HPLC) és spektroszkópiás technikákkal (MS, MALDI MS, FT-IR) vizsgáltuk.

A 3. ábrán az egyik TR és hígított formalin oldat közötti friss reakcióelegy MALDI MS spektrumát láthatjuk, ahol az alap molekula (227 m/z) és a 240-es és 276-os tömegszámú új származék figyelhető meg, ez utóbbit izolálni is tudtuk.



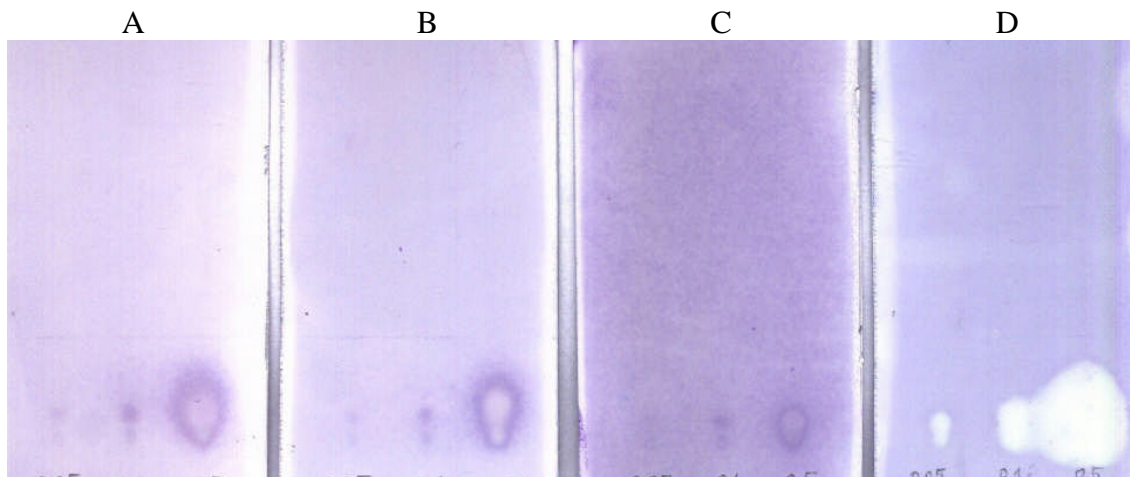
3. ábra A TR és a formalin oldat közötti friss reakcióelegy MALDI MS spektruma

A MALDI MS technikát különösen jól tudtuk használni e szokatlan, de figyelemre méltó reakciók tanulmányozására . Az izomerek elválasztására pedig HPLC és részben OPLC technikát használtunk. A vizsgálatainkat –az eredeti elképzeléseket, terveket meghaladóan-kvantumkémiai vizsgálatokkal is kiegészítettük: így a 3. ábrán látható 240-es tömegszámú molekula létét a kvantumkémiai számítások is megerősítették, s feltételezhető a reakcióban a fenolos hidroxil kicserélése aldehid csoportra.

E modell kísérletekben tehát megállapítottuk, hogy a **TR és néhány rokonvegyülete HCHO befogó, mobilizáló molekulának tekinthető** és amely reakció a biológiai rendszerekben is lejátszódhat, aminek jelentősége van.

TR és a HCHO és más kis molekulák közötti reakció tanulmányozása BioAréna-rendszerben

A TR és a HCHO között különösen érdekessé és jelentőssé vált alapreakció – a hatásmechanizmus jobb megismeréséhez -igényelte a mikrokémiai és mikrobiokémiai szintű vizsgálatokat, s ez jól sikerült az un. BioAréna rendszer felhasználásával [20]. A BioAréna rendszerben a direkt bioautográfiát továbbfejlesztettük az **un. HCHO /ózon (O₃)elv** [20,21] értelmében: a rétegekromatogramon elválasztott anyagokat – szükség szerint- kiterjedt spektroszkópiai vizsgálatnak vetettük alá, denzitometráltuk, de különböző kémiai reakciókat is alkalmaztunk (akár párhuzamos kifejlesztések segítségével). Az antibiotikus hatásokat az alkalmazott teszt mikroorganizmus segítségével mutattuk ki, s ez még mindig **direkt bioautográfia**, Ha a pl. baktériumsejteket tartalmazó kulturmédiumot szétosztjuk, s a párhuzamos kifejlesztésekkel kapott kromatogram lapokhoz használt kulturmédium részleteket más és más bioaktív anyagokkal egészítjük ki, így lehetőség van különböző reakciók megismerésére, azaz így **az adszorbensréteg sejtek és kémikáliák küzdőterévé (arénájává) változik**. S könnyű belátni, hogy ilyen reakciók alkalmazása korlátlan lehet. A biológiai detektálás, és/vagy festés (MTT) után is különböző kromatográfiás, denzitometriás és spektroszkópiás értékeléseket végzünk ill. végezhetünk.



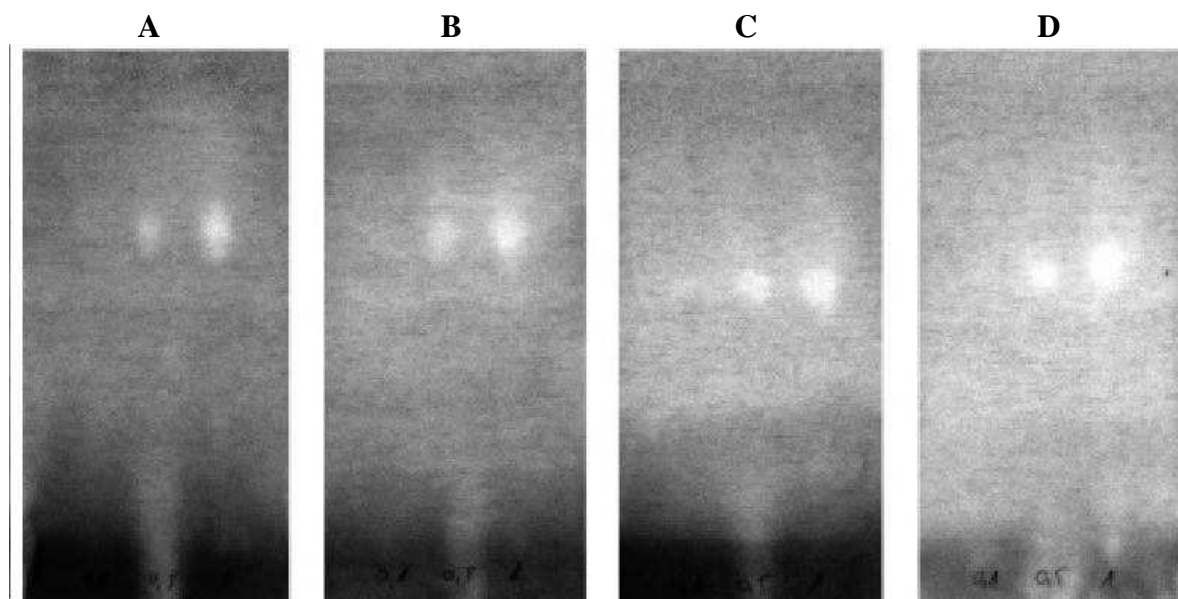
4. ábra A HCHO megvonása és mobilizálása (szállítása) az élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*)gátló TR molekuláktól ill. -hoz (mind a négy esetben 0,05, 0,1 és 0,5 µg TR van balról jobbra a réteglapon) különböző endogén anyagok segítségével. Kromatográfiás feltételek: szilikagél 60 F₂₅₄ (Merck 120^oC-on 3 óráig kondicionált), kifejlesztő elegy. kloroform-metanol, 80+8; automata OPLC készülék, külső nyomás, 5 MPa
 Biológiai feltételek: **A:** élesztő szuszpenzióba (3 g élesztő 100 mL vízben) mártott lemez (kontroll); **B:** A + 2 mg L-arginin 1 mL élesztő szuszpenzióban; **C:** A + 2 g glutation 1 mL élesztő szuszpenzióban; **D:** A + 4 mg CuSO₄.5 H₂O 100 mL élesztő szuszpenzióban.

A nagyszámú kísérletből a 4. ábrán a bor képződésében alapvető szerepet játszó élesztő hatását próbáltuk ki BioAréna rendszerben. **Az endogén HCHO befogó molekulák, mint az L- arginin (B réteglap) és glutation (C réteglap) jelentősen csökkentették a TR élesztőgátló hatását, míg a Cu(II) ionok adagolása drámaian növelte az alpmolekula élesztőgátló hatását.** Ma már tudjuk, hogy a nyomelemek így a Cu(II) ion is HCHO-mobilizáló, szállító, s koordináló molekula. **Egy Cu(II) ion alapállapotban 4 molekula HCHO-t szállít hidroximetil-csoport fomájában, míg a dimér forma 8 molekula HCHO-t mobilizál és szállít [22].** (Ez utóbbi esetben a feltételezésünk szerint a következő reakciók játszódnak le: jelen esetben a legnagyobb mennyiségű TR (azaz 500 ng)

közel minden molekulája is HCHO-hoz jut a Cu(II) segítségével, majd a hidroximetil-csoportokból felszabaduló nascens HCHO öli az élesztősejteket.

A BioAréna rendszerben a TR-rel kapcsolatban elért eredményeket így foglalhatjuk össze:

- sikerült megállapítani, hogy **a mikroszervezetek a szaporodási görbe mentén a log-fázisban produkálnak legnagyobb hatást**, nyilván összefüggésben a mobilizálható HCHO-val;
- különböző endogén (pl.L-arginin, glutation) és exogén molekulák (pl. dimedon, szemikarbazid) adagolása a kulturmédiumhoz a különböző mikrobagátló hatást csökkentette, azaz úgy látszik, hogy az antibiotikus hatásban a HCHO-nak mindig szerepe van;
- **nyomelemek (átmeneti fémionok) eltérő mértékben mindig hatásvnövekedéshez vezettek(esetenként drámai módon)**, s ennek a gyakorlati kihasználása a közel jövő feladata lesz;



5. ábra Néhány átmeneti fém ion hatása a TR antibakteriális hatására *Pseudomonas* sp. sejtek ellen

A: kontroll ; B: A + FeSO₄; C: A + Mn SO₄ ; D: A + ZnSO₄

- **a TR kettős (kétlépcsős) hatását sikerült bizonyítani**, amit más rendszerekre is kiterjeszhetőnek tartunk (pl. nyomelemek);

- A TR-rel végzett előzetes O₃-vizsgálatok egyre nyilvánvalóbbá teszik, hogy az endogén, pl. **a sejten keletkező HCHO reakcióba léphet az endogén H₂O₂-vel**, mely reakcióban elsősorban szingulett oxigén (¹O₂) keletkezik, ami viszont a víz molekulákat dihidrogén-trioxiddá oxidálja, mely labilis vegyület diszproporcionál, s többek között O₃ képződik, szabadul fel (l. még 6. ábra). Ez a reakciósor a rétegekromatogramokon a foltokban is lejátszódhat a biológiai értékelés során;

- vizsgálataink szerint **a TR antibiotikus hatását nem O₃ molekulákon át fejtí ki**, azaz innen ered a TR már jól ismert nem toxikus volta. Összehasonlítottuk a TR-t a ténylegesen nagyon toxikus paklitaxellel (diterpén alkaloid), a tiszafából izolált tumorgátló anyaggal, a TR itt is nem toxikusságával tünt ki;

- a nagyszámú más endogén anyag kipróbálása (pl. C vitamin, E vitamin, metilezett bázikus aminosavak, ózon befogó molekulák, mint Indigokarmin, vagy limonén) megerősítette a BioAréna különleges lehetőségeit a hatásmechanizmus s egyéb vizsgálatokban;
- az elért eredményekből az is következik, hogy a TR különleges reakciókon keresztül fejt ki legkülönbözőbb jótékony hatását, s maga az alapmolekula csak hordozóként vesz részt ezekben a reakciókban.

A vörös és fehér bor összehasonlító vizsgálatok

Az eredeti terveknek megfelelően a BioAréna-rendszerben különböző hazai vörös és fehér borfajták antibakteriális spektrumát is összehasonlítottuk. Megállapítottuk, hogy **lényegében az összes vizsgált hazai fehér bor csak kis mennyiségben tartalmazott TR-t**. De egyéb antibiotikus hatású anyagok előfordulása is mérsékelt volt. Ha viszont az antibiotikus hatás (2. lépés) csökkent mértékű [23], akkor az alapelvől következően az első lépésnél, a kémiai védelemnél is mérsékelt hatást lehet várni. Nagyon érdekes az is, hogy a fehér bor minták kimutatható antibakteriális hatása általában más képet mutat, amiből az is következik, hogy más vegyületek fejtenek ott ki antibiotikus hatást. A legújabb irodalom szerint **tirozol és hidroxitirozol molekulák kellő mennyisége a fehér borban jó hatások hordozója lehet**. Ezt a lehetőséget a közel jövőben meg kell vizsgálni, hiszen a bemutatott kettős hatás e vegyületekből nem következik [24,25], de a negatív biológiai hatás igen, hiszen endogén körülmények között e molekulák HCHO generátorok lehetnek.

A fehér és vörös bor fajták összehasonlítása azért is indokolt, hiszen egyes szerzők szerint **a fehér bort fogyasztó vidékeken Franciaországban pl. a szivkoszorúér megbetegedések száma és a halálesetek száma 50%-kal nagyobb, a dél-franciaországi területekhez képest**.

Nagyon fontos és lényeges megfigyelést tettünk összehasonlító vizsgálatainknál, nevezetesen egy eddig borokban le nem irt sztilbén származékot azonosítottunk a vörös borokban. Ez a vegyület **a bibenzil-3, 5,4'-triol (BB)**, ami lényegében a TR redukált formája az α,β -kettős kötésnél, s **biológiai hatása kb. fele az eredeti TR-nek** [23]. Egyes hazai, minőséginek tartott vörös borokban a BB mennyisége drámaian emelkedett volt, s kiderült, hogy ezek az intenzív redukív technológia termékei, azaz itt is felülvizsgálatra van szükség, a két alap erjesztési eljárás megbízható összehasonlítására. S mindez csak fokozza a fehér borok témakör kényességét, hiszen millió hektoliterek állnak fogyasztás előtt az egész világon.

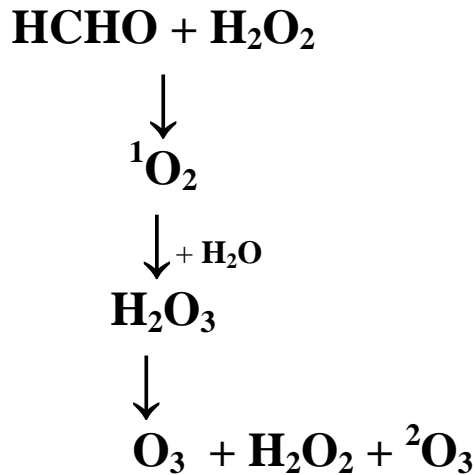
Végül a vörös borok antibakteriális hatását vizsgálva, **az egész réteg arénában észlelt antibiotikus foltok intenzitása jelentősen csökkent**, ha HCHO befogó molekulát (pl. glutationt) adtunk a rendszerhez, azaz e vizsgálatokból is az következik, hogy **az antibiotikus hatás a legkülönbözőbb vegyülettípusoknál HCHO-n és/vagy O₃-on keresztül következik be**.

A transz-rezveratrol hatásmechanizmusának főbb lépései és jellegzetességei

Egyre nyilvánvalóbb egyéb vizsgálatokból is, hogy az endogén keletkező HCHO reakcióba léphet az endogén H₂O₂-vel, mely reakcióban elsősorban ¹O₂ keletkezik, ami viszont a víz molekulákat dihidrogén-trioxiddá oxidálja, mely labilis vegyület diszproporcionál, és többek között O₃ képződik, mint a 6. ábra mutatja e reakciósort. Az a tény, hogy **a TR esetében lényegében nem tudtunk O₃ képződést kimutatni a foltokban**, arra utal, hogy **a TR nem indukál pl. H₂O₂ felhalmozódást**, mely molekula az ¹O₂ képződés egyik alapmolekulája.

A TR-rel végzett vizsgálatok eredményei több ponton is kiterjeszthetők: **a kettős hatást más molekuláknál is célszerű figyelembe venni**, s a toxikológiai hatás és az O₃

felhalmozódás kapcsolatát pedig elmélyülten tovább kell vizsgálni. Az endogén O₃ vizsgálata hatékony vizsgálati módszerek kidolgozását igényli, hiszen az exogén O₃ jelenlétével is mindig számolni kell



6. ábra A HCHO és a H₂O₂ kölcsönhatási reakciójából kiindulóan keletkező főbb védekező vegyületek képződési útja (antitestek és) antibiotikus vegyületek , mint a TR esetében
Egyszerűsített reakciósor

A 6. ábrán összegzésül felírt, a **H₂O₂ es HCHO kölcsönhatási reakciójából kiinduló** reakciósor az antibiotikus (antiproliferatív hatású) TR hatásaihoz magyarázatul szolgál. Várhatóan e kis reaktív molekulák a következő időben nem csupán a TR esetében kerülnek előtérbe. Mivel a legújabb vizsgálatok szerint **a HCHO és a H₂O₂ valamennyi élő rendszerben általánosan előfordulnak, azaz nélkülözhetetlen összetevők**, ezért a biológiai világ természetes betegség ellenállóságának alaplakuláit adó, generáló komponensekké lépnek elő.

Budapest, 2009. február 28.

Dr. Tyihák Ernő
vezető kutató

Irodalom

- [1] Fremont L., Life Sci. 2000, **66**, 663-673.
- [2] Wu J.M. et al., Intern. J. Mol. Med. 2001, **8**, 3-17.
- [3] Tyihák E. et al., Acta Hort. 2003, **597**, 159-165.
- [4] Tyihák E. and Király-Véghely Zs., Bulletin de l'OIV 2008, **81**, 65-74.
- [5] Jang M. Et al., Science 1997, **275**, 218-220.
- [6] Renaud S., De Lorgeril M., Lancet 1992, **339**, 1523-1526.
- [7] Bertelli A.A.E. et al., Drugs Exp. Clin. Res., 1996, **22**, 61-65.
- [8] Uenobe F., Nakamura Si., Miyazawa M., Mut. Res. 1997, **373**, 197-200.
- [9] Cheong H., Ryu S.Y., Kim K.M., Planta Med. 1999, **65**, 266-268.
- [10] Marambaud P., Zhao H., Davies P., J. Biol. Chem. 2005, **280**, 37377-37382.
- [11] Ingham J.L., Phytochem. 1976, **15**, 1791-1793.
- [12] Mahady G.B., Pendland S.L. Am. J. Gastroenterol. 2000, **95**, 1849.
- [13] Docherty J.J. et al., Antiviral Res. 2005, **67**, 155-162.
- [14] Hong W.K., Sporn M.B., Science 1997, **278**, 1073-1077.
- [15] Garvin S., Ollinger K., Dabrosin C., Cancer Lett. 2006, **231**, 113-122.
- [16] Jimenez J.B. et al., J. Agric. Food Chem. 2005, **53**, 1526-1530.
- [17] Delmas D. et al., Curr. Drug Targets 2006, **7**, 423-442.
- [18] Gautam S.C., Cancer Lett. 2000, **25**, 639-645.
- [19] Tyihák E. et al., Acta Biol. Hung. 1998, **49**, 225-238.
- [20] Tyihák E. et al., J. Planar Chromatogr. 2008, **21**, 65-70.
- [21] Tyihák E. et al. J. Planar Chromatogr. 2008, **21**, 77-82.
- [22] Tyihák E. et al., (előkészületben)
- [23] Király-Véghely Zs. et al., J. Liquid Chromatography and RT (2009, elfogadva)
- [24] Bertelli A. et al., Drugs Exp. Clin. Res. 2002, **28**, 11-15
- [25] Dudley J.I. et al., J. Agric. Food Chem., 2008, **56**, 9362-73.