

KOSARAS ESZTER PHD HALLGATÓ¹, KATKÓ MÓNICA PHD HALLGATÓ¹, PARAGH GYÖRGY DR.¹, BALLA JÓZSEF DR.¹, FRANCESCO GALLI DR. PHD², VARGA ZSUZSA DR. PHD¹

¹DEOEC, I. Belgyógyászati Klinika, Debrecen

²Department of Internal Medicine, Section of Applied Biochemistry and Nutritional Sciences University of Perugia, Italy

A TOKOFEROL HOMOLÓGOK BIOLÓGIAI HATÁSOSÁGA

A gamma-tokoferol kiemelt szerepe a forbol-észter stimulálta humán neutrofilek ROS termelésének gátlásában.

A NEUTROFILEK „REAKTÍV-OXIGÉN-EREDETŰ” ANYAGOK (ROS) TERMELÉSE SZÁMOS KÓRKÉPBE FOKOZÓDIK. A TERMÉSZETES EREDETŰ ANTIOXIDÁNSOK A JELÁTVITEL KÜLÖNBÖZŐ ELEMEIRE HATVA BEFOLYÁSOLJÁK ROS-SZENZITÍV ENZIMEK, TRANZKRIPCIÓS FAKTOROK (PL. NUKLEÁRIS FAKTOR- κ B) AKTIVÁLÓDÁSÁT. A SZERVEZETBEN AZ E-VITAMIN-VEGYÜLETEK (α -, γ -, δ -TOKOFEROL) FONTOS LIPIDOLDÉKONY ANTIOXIDÁNSOK. A PREVENCIÓS VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI AZONBAN NEM HOZTAK EGYÉRTLMŰ EREDMÉNYT AZ α -TOKOFEROL ESETÉBEN. AZ UTÓBBI ÉVEK VIZSGÁLATAI SZERINT A HIPOMETILÁLT HOMOLÓGOK (γ - ÉS δ -TOKOFEROL) IS RENDELKEZNEK BIOLÓGIAI AKTIVITÁSSAL, AMELY HATÁS MEGHALADHATJA A SOKAT VIZSGÁLT α -HOMOLÓGÉT.

JELEN MUNKÁNKBAN A TOKOFEROLOK ÉS VÍZOLDHATÓ METABOLITJAIK (α -, γ -, δ -KARBOXIETIL-HIDROXIKROMAN, CEHC) NEUTROFILEK OXIDÁCIÓS ROBBANÁSÁRA KIFEJTETT HATÁSAIT VIZSGÁLTUK. MEGÁLLAPÍTOTTUK, HOGY NEMCSAK AZ α -, HANEM A HIPOMETILÁLT γ -, δ -TOKOFEROL ÉS VÍZOLDHATÓ METABOLITJAIK (α -, γ - ÉS δ -CEHC) IS GÁTOLJÁK A NEUTROFILEK FORBOL-ÉSZTER STIMULÁLTA SZUPEROXID ANION ($O_2^{\cdot-}$) TERMELÉSÉT. A CSÖKKENT $O_2^{\cdot-}$ TERMELÉS MINDEN VEGYÜLETNÉL A PKC-ENZIM GÁTLÁSÁRA VEZETHETŐ VISSZA, AMELYBEN A γ ÉS δ -HOMOLÓG HATÁSOSABB, MINT AZ α -TOKOFEROL ÉS A VÍZOLDHATÓ METABOLITOK NAGYOBB MÉRTÉKBEN GÁTOLTÁK A PKC-T, MINT AZ ANYAVEGYÜLETEK. KÜLÖNBÉG VOLT A TOKOFEROLOK ÉS CEHC-VEGYÜLETEK AKTIVÁLT NADPH-OXIDÁZRA KIFEJTETT HATÁSÁBAN: AZ ELŐBBIEK GÁTOLTÁK, A CEHC-VEGYÜLETEK PEDIG HATÁSTALANOK VOLTAK. FIZIOLÓGIÁS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT TEHÁT AZ E-VITAMIN-VEGYÜLETEK ÉS VÍZOLDHATÓ METABOLITJAIK, A PKC-AKTIVITÁSÁNAK GÁTLÁSÁN ÁT, HOZZÁJÁRULNAK A NEUTROFILEK $O_2^{\cdot-}$ TERMELÉSÉNEK SZABÁLYOZÁSÁHOZ. A PKC-GÁTLÁS KIFEJTÉSÉBEN A METILCSOPORTOK ($\gamma > \delta > \alpha$) ÉS A FITIL OLDALLÁNC HIÁNYA (CEHC > TOKOFEROL) ELŐNYT JELENT. AZ AKTIVÁLT NADPH-OXIDÁZ $O_2^{\cdot-}$ TERMELÉSÉT AZONBAN CSAK A TOKOFEROLOK KÉPESEK GÁTOLNI, AZAZ A FITIL-OLDALLÁNC ELVESZTÉSE AZ AKTIVITÁS ELVESZTÉSÉT OKOZZA. ÖSSZESEGÉBEN, IGAZOLTUK, HOGY A NEUTROFILEK ROS-TERMELÉSNEK GÁTLÁSÁBAN NEMCSAK AZ α -, HANEM A HIPOMETILÁLT HOMOLÓGOK ÉS CEHC-METABOLITOK IS SZEREPET JÁTSZANAK.

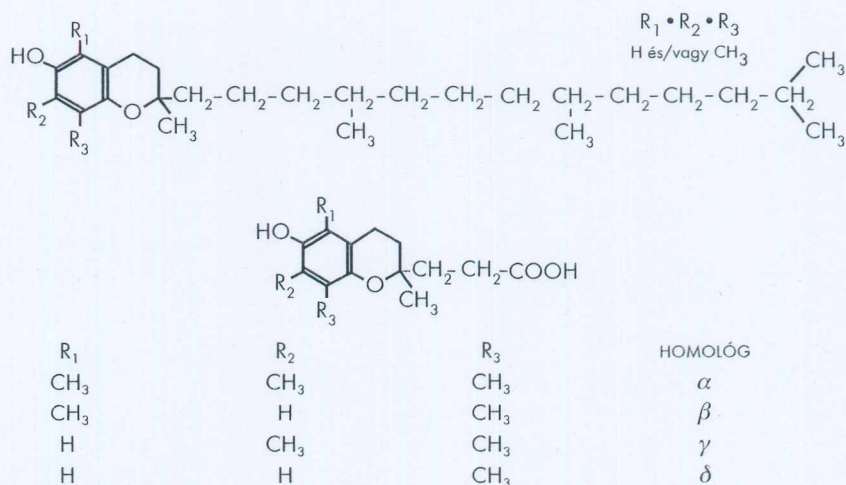
Kulcsszavak: neutrofil, ROS-termelés, PKC, NADPH-oxidáz, tokoferol homológok, tokoferol metabolitok

ENHANCED SUPEROXIDE ANION PRODUCTION BY NEUTROPHILS WAS OBSERVED IN SEVERAL DISEASES. NATURAL ANTIOXIDANTS AFFECT SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS AND REGULATE TRANSCRIPTION OF REDOX-SENSITIVE GENES SUCH AS NUCLEAR-KAPPA B. VITAMIN E COMPOUNDS (α -, γ -, δ -TOKOFEROL) ARE IMPORTANT LIPOPHIL ANTIOXIDANTS. HOWEVER, RESULTS OF PREVENTION STUDIES ARE CONTRADICTORY CONSIDERING α -TOKOFEROL SUPPLEMENTATION. RECENTLY, THE HYPO-METHYLATED TOCOPHEROLS (γ - AND δ -TOKOFEROL) WERE FOUND TO POSSESS BIOLOGICAL ACTIVITY, AND THIS ACTIVITY MIGHT BE HIGHER THAN THE WELL CHARACTERIZED α -TOKOFEROL. IN THIS STUDY WE INVESTIGATED THE CONCENTRATION-DEPENDENT EFFECT OF TOCOPHEROLS AND WATER-SOLUBLE (CEHC, 2,2'-CARBOXYETHYL HYDROXYCHROMAN) METABOLITES ON A KEY EVENT IN OXIDATIVE STRESS, EG. ON OXIDATIVE BURST OF PHORBOL-ESTER STIMULATED NEUTROPHILS. IT WAS FOUND THAT ALL TOCOPHEROL AND CEHC COMPOUNDS INHIBITED SUPEROXIDE ANION PRODUCTION OF NEUTROPHILS. THE DECREASED SUPEROXIDE ANION PRODUCTION WAS DUE TO THE INHIBITION OF TRANSLOCATION AND ACTIVATION OF PROTEIN KINASE C (PKC). IN THIS ASPECT, γ - AND δ -TOKOFEROL PROVED TO BE MORE ACTIVE AS α -TOKOFEROL, AND ALL CEHC METABOLITES WERE STRONGER INHIBITORS OF PKC THAN TOCOPHEROL PRECURSORS. TOCOPHEROLS, BUT NOT CEHCs, DIRECTLY INHIBITED THE SUPEROXIDE ANION PRODUCTION OF FULLY ACTIVATED NICOTINE-ADENINE-DINUCLEOTIDE PHOSPHATE (NADPH) OXIDASE. IN SUMMARY, AT PHYSIOLOGICAL CONCENTRATIONS OF ALL TOCOPHEROL AND CEHC COMPOUNDS INHIBITED PMA-STIMULATED SUPEROXIDE ANION PRODUCTION OF NEUTROPHILS VIA INHIBITION OF PKC ACTIVITY. IN THIS INHIBITION THE LACK OF PHYTYL CHAIN AND METHYL GROUPS ARE PREFERRED. HOWEVER, THE DIRECT INHIBITION OF SUPEROXIDE ANION PRODUCTION BY NADPH OXIDASE REQUIRED PRESENCE OF PHYTYL CHAIN SINCE CEHC METABOLITES PROVED TO BE INEFFECTIVE. IN CONCLUSION, WE CONFIRMED, THAT IN THE INHIBITION OF THE ROS PRODUCTION BY NEUTROPHILS, NOT ONLY α -TOKOFEROL BUT ALSO HYPO-METHYLATED HOMOLOGUES AND CEHC COMPOUNDS PLAY IMPORTANT ROLE.

Az E-vitamin az egyik legfontosabb természetben előforduló, zsírban oldódó vitamin, védi a többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmazó lipideket és lipoproteineket a reaktív oxigén eredetű anyagok (ROS) okozta károsodástól (a lipid-peroxidációtól), ami a gyökfogyó tulajdonságra vezethető vissza. Ennek következtében véd olyan körkpek kialakulásával szemben, amelyek fokozott ROS-termeléssel járnak, mint pl. krónikus és degeneratív elváltozások, az ateroszklerózis és a kardiovaszkuláris megbetegedések (1, 2). A védő hatást epidemiológiai vizsgálatok alátámasztották, amelyek többsége kizárólag az α -homológokra vonatkozik (3, 4) – az „E vitamin” ugyanis, nem egységes anyag, négy, különböző számú metilcsoportot tartalmazó homológ keveréke (1. ábra), azonban legalább ennyi vizsgálati eredmény ismert, amelyben ezt a védő hatást nem tudták igazolni (5, 6).

A keringésben a ROS-termelésért részben a neutrofilek felelősek. A neutrofilek fokozott ROS-termelését leírták pl. a kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás szempontjából jelentős kockázatot jelentő, hiperlipidémiákban (7, 8). Ugyanakkor, az E-vitaminnak szerepe van az immunsejtek pl. neutrofilek, monociták szuperoxid anion ($O_2^{\cdot-}$) és hidrogén-peroxid termelésének szabályozásában is (9, 10), amelyben az α -tokoferol antioxidáns hatását elsősorban a proteinkináz-C (PKC) enzim aktivitásának gátlásán át fejti ki. A PKC szabályozza többek között a tirozín foszforilációjától függő jelátviteli utakat (9) és az immunsejtek $O_2^{\cdot-}$ termelését (10). Az utóbbi évek kutatási eredményei azonban arra is rámutattak, hogy nemcsak az α -tokoferol, hanem hipometilált homológja a γ -tokoferol (1. ábra) is jelentős antioxidáns és biológiai aktivitással rendelkezik (11-13). Épp ezért felül kell bíráltni azt a nézetet, amely szerint a tokoferolok közül elsősorban az α -tokoferolnak van biológiai jelentősége. Bár a természetben a hipometilált homológok előfordulási gyakorisága kisebb, mint az α -tokoferolé, mérési eredmények bizonyítják, hogy az élő szervezet szöveteiben a γ -tokoferol különböző mértékben akkumulálódik és mennyisége a totál tokoferol tartalomnak 50%-át is eléri (11). Számos kísérleti eredmény bizonyítja a γ -tokoferol anti-

1. ÁBRA: TOKOFEROLOK ÉS METABOLITJAIK SZERKEZETE



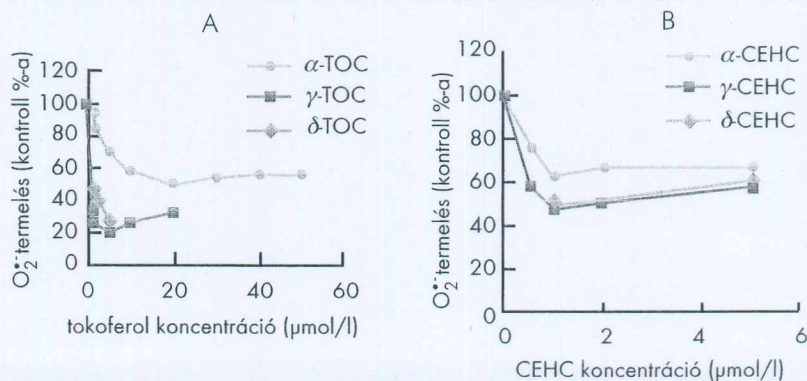
oxidáns képességét és biológiai aktivitását, amely egyes rendszerekben meg is haladhatja az α -tokoferolét (14-16). A teljesen hipometilált homológokról, a δ -tokoferolról, is bizonyosodott, hogy vannak olyan körülmények, amelyek között jobban védi a zsírsavakat a lipidperoxidációtól, mint az α -tokoferol (17).

Bár a tokoferolok kismértékben metabolizálódnak szervezetünkben, mégis az analitikai technikák fejlődésének tulajdoníthatóan, a keringésben és a vizeletben egy vízoldható tulajdonságú metabolit, a karboxietil-hidroxiromán (CEHC), is azonosíthatóvá vált (1. ábra). A CEHC vízoldható metabolitok, a májban keletkeznek tokoferolból és tokotrienolból, megtartják peroxil gyökfogyó tulajdonságukat (18, 19) és biológiai aktivitásukat, képesek pl. a ciklindependens jelátvitel downregulációján keresztül humán daganatos sejtvonal proliferációjának gátlására (20, 21) és az immunsejtek működésének befolyásolására (22).

A tokoferol homológok és vízoldható metabolitjaik esetében még nem történt szisztematikus vizsgálat neutrofilekben a szuperoxid anion termelés befolyásoló képesség összehasonlítására, pedig más sejttípusban, pl. C6 glioma sejtekben, bizonyosodott, hogy a γ -tokoferol nagyobb mértékben gátolja a PKC-aktivitást, mint az α -tokoferol (20). Korábbi vizsgálatunkban kimutattuk, hogy más típusú antioxidánsok esetében kicsi szerkezet-módosítás jelentős mértékben képes a szerkezet és aktivitás közti kapcsolatot befolyásolni (23, 24).

Jelen munkánkban épp ezért vizsgáltuk a tokoferolok alfa-, gamma-, delta-homológjainak és vízoldható metabolitjainak hatását humán neutrofilek forbol-észter (PMA) stimulálta szuperoxid anion termelésének alakulására azzal a céllal, hogy meghatározzuk van-e különbség a homológok hatásában, s ha igen, melyik molekula képes a ROS-termelést leghatásosabban befolyásolni. Vizsgálataink során

2. ÁBRA: TOKOFEROLOK (A) ÉS VÍZOLDHATÓ METABOLITJAIK (B) KONCENTRÁCIÓFÜGGŐ HATÁSA HUMÁN NEUTROFILEK FORBOL-MIRISZTÁT ACETÁT STIMULÁLTA SZUPEROXID ANION TERMELÉSÉRE



meghatároztuk élő sejtekben a szuper-oxid anion termelést, a PKC-aktivitást, valamint a PMA-val stimulált neutrofil lizátumban az anyagok közvetlen, a teljesen aktivált NADPH-oxidázra kifejett hatását. Annak eldöntésére, hogy a molekulák rendelkeznek-e direkt $O_2^{\cdot-}$ gyökfogó tulajdonsággal xantinn/xantin-oxidáz rendszert használtunk.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

ANYAGOK

A citokróm C (IV típusú), a xantin, a xantin-oxidáz, a Histopaque 1077, a Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) – összetétele: 0,137 M NaCl, 5,4 mM KCl, 0,25 mM Na_2HPO_4 , 0,44 mM KH_2PO_4 , 1,3 mM $CaCl_2$, 1,0 mM $MgSO_4$, 4,2 mM $NaHCO_3$ és 10 mM glukóz, a dimetil-szulfoxid (DMSO), a redukált NADPH és a PMA Sigma gyártmányú volt (Sigma, St. Louis, MO, USA). Az α -, γ - és δ - tokoferol ugyan-csak Sigma gyártmányú volt, míg a CEHC homológokat az Eisa Company állította elő és ajándékozta Dr. Gallinak (Eisai Co., Japan). Az anyagokat DMSO-ban oldottuk, és hígítottuk a kívánt koncentráció eléréséig.

NEUTROFIL SZEPARÁLÁS

A neutrofileket heparinnal alvadásgá-tolt vérből Boyum módszere szerint sűrűség-grádiens (Histopaque 1077) centrifugálással szeparáltuk (25). A sejtek életképessége 95% volt Giemsa és tripankék festés alapján. Kísérleteinkhez 15 egészséges klinikai dolgozótól vettünk vért. Bevonási kritérium a következő volt: nemdohányzó, E-vitamin-pótlásban nem részesülő önkéntes, akiknek étrendje a vizsgálatot megelőző 72 órában tartalmazta a megfelelő α -tokoferol mennyiséget (6–12 mg/nap), amit a plazma tokoferol tartalmának meghatározásával ellenőriztünk (26).

A SZUPEROXID ANION TERMELÉS MÉRÉSE

Babior és mtsai módszere alapján történt (27) az általunk korábban kidolgozott mikro-módszer szerint (28). A neutrofileket 20 percig $37^\circ C$ -on előinkubáltuk a tokoferol homológokkal és a vízdoldható metabolitokkal. A használt koncentrációtartományok a fizio-

lógias körülmények között előforduló koncentrációk voltak: α -TOC: 10–50 $\mu mol/l$; γ -TOC: 0,1–4 $\mu mol/l$, δ -TOC: 0,1–4 $\mu mol/l$, α -CEHC: 0,05–1,2 $\mu mol/l$; γ -CEHC: 0,05–1,2 $\mu mol/l$; és δ -CEHC: 0,05–1,2 $\mu mol/l$ (11). Az előinkubálást követően a sejteket 10^{-7} M végkoncentrációjú PMA-val stimuláltuk. A $O_2^{\cdot-}$ termelést a citokróm C segítségével spektrofotometriásan mértük 550 nm-en. 492 nm szolgált háttér meghatározásra. Minden esetben három párhuzamos meghatározás történt. Az eredményeket a kontroll százalékaiban adtuk meg a következő egyenlet szerint: $O_2^{\cdot-}$ termelés a kontroll %-ában = $(A_s/A_c) \times 100$, ahol az A_c a PMA stimulálta kontrollban mért abszorbancia és az A_s a mintában mért abszorbancia. Az eredményeket átlag \pm SD formában adjuk meg.

MARADÉK PKC-AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA A CITOSZOLBAN

A PKC-aktivitást a PMA-val stimulált neutrofilek citoszoljában a korábban leírt módon határoztuk meg (29) ELISA-kitt segítségével (Calbiochem-Novabiochem Co., San Diego, CA, USA). A sejteket ($200 \mu l$ 5×10^6 sejt/ml) a tokoferol homológokkal és metabolitjaikkal Hank's pufferben $37^\circ C$ -on előinkubáltuk, majd stimuláltuk 10^{-7} M PMA-val 3 percig. A reakciót tízszeres mennyiségű jéghideg foszfát-puffer hozzáadásával állítottuk le. A centrifugálás után a sejteket a kittben található pufferben vettük fel (50 mM Tris-HCl, 50 mM β -mercaptoethanol, 10 mM EGTA, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM benzamidine, pH 7,5) majd feltártuk. A sejtlizátumot centrifugáltuk ($13000 \times g$, 1 óra, $4^\circ C$) és a felülúszóból közvetlenül határoztuk meg a PKC-aktivitást. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 25 mM Tris-HCl (pH 7,0), 0,3 mM $MgCl_2$, 0,1 mM ATP, 2 mM $CaCl_2$, 50 $\mu g/ml$ foszfadiliszerein, 0,5 mM EDTA, 1 mM EGTA and 5 mM β -merkaptotetanol. A citoszol fehérjekoncentrációját Lowry módszer alapján (30) határoztuk meg. Az eredményeket a fehérjére vonatkoztatott abszorbancia értékben adtuk meg. Minden vizsgálatot három különböző donortól származó neutrofilekkel végeztük és minden esetben két párhuzamos meghatározás történt.

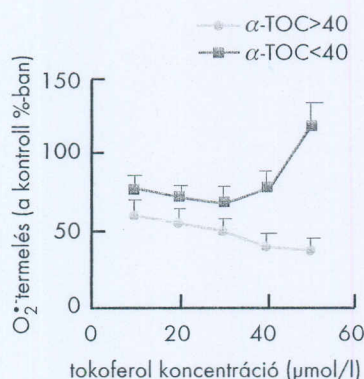
NADPH-OXIDÁZ AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA (31)

Az anyagok aktivált NADPH-oxidázra kifejett hatását sejtmentes rendszerben határoztuk meg. A teljesen aktivált NADPH-oxidáz előállításához az intakt sejteket PMA-val stimuláltuk HBSS-ben 3 percig. A sejteket feltártuk és a lizátumot jégen tartottuk a felhasználásig. A tokoferolokat és a vízdoldható metabolitokat a megfelelő koncentrációban a sejtlizátumhoz adtuk, és az elegyet 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A reakciót NADPH hozzáadásával indítottuk, az enzimaktivitást citokróm C segítségével határoztuk meg. A reakciót 550 nm-en követtük 5 percig, 492 nm-en mért abszorbancia levonása után. A NADPH-oxidáz aktivitást a percenkénti optikai denzitás változás adta meg. Az eredményeket a kontroll százalékaiban adtuk meg a következő egyenlet szerint: NADPH-oxidáz aktivitás a kontroll %-ában = $(\Delta V_s/\Delta V_c) \times 100$, ahol ΔV_c a percenkénti abszorbancia változás a kontrollban és ΔV_s a percenkénti abszorbancia változás a mintában. Minden anyagnál és koncentrációnál három-három párhuzamos meghatározás történt, amit öt különböző alkalommal megismételtünk.

XANTIN-OXIDÁZ AKTIVITÁS GÁTLÁS ÉS SZUPER-OXID ANION GYÖKFOGÁS MEGHATÁROZÁSA (32, 24)

A xantin-oxidáz aktivitását xantin szubsztrát alkalmazásával határoztuk meg, a reakcióban keletkező húgysav mennyiségének mérésével (295 nm-en) spektrofotetriás módszerrel. A reakcióelegy összetétele a következő volt: xantin (60 μM végkoncentrációban), xantin-oxidáz enzim (0,04 U/ml végkoncentrációban), valamint a vizsgálni kívánt anyag a megfelelő koncentrációban. A reakciót a xantin-oxidáz hozzáadásával indítottuk, majd a húgysavtermelődést 3 percig követtük nyomon. Az enzimaktivitásban bekövetkező változást a kontroll százalékaiban fejeztük ki a következő egyenlet szerint: xantin-oxidáz aktivitás a kontroll %-ában = $(\Delta V_s/\Delta V_c) \times 100$, ahol ΔV_c a percenkénti abszorbancia változás a kontrollban és ΔV_s a percenkénti abszorbancia változás a mintában. Egy másik kísérletben citokróm C-t

3. ÁBRA: AZ ALFA-TOKOFEROL KONCENTRÁCIÓ FÜGGŐ HATÁSA HUMÁN NEUTROFILEK SZUPEROXID ANION TERMELÉSÉRE A DONOROK PLAZMA ALFA-TOKOFEROL TARTALMÁTÓL FÜGGŐEN



adtunk a reakcióelegyhez, amely a keletkezett szuperoxid anionnal lép reakcióba. A szuperoxid anion termelésben bekövetkező változás, a húgysavtermelésben bekövetkező változással összevetve mutatja az anyagok szuperoxid anion gyökfogyó tulajdonságát. Minden esetben három párhuzamos meghatározás történt, három különböző alkalommal.

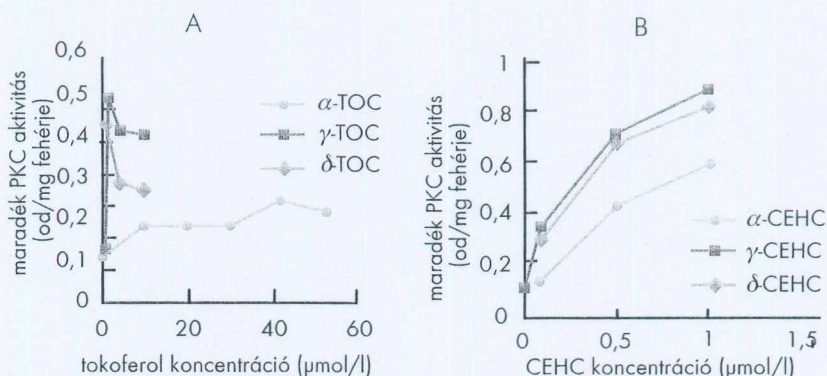
STATISZTIKAI ANALÍZIS

Minden adatot átlag ± SD formában fejeztünk ki. A teszt és a kontroll minták közti különbségek megállapításához párosított t próbát használtunk, a $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

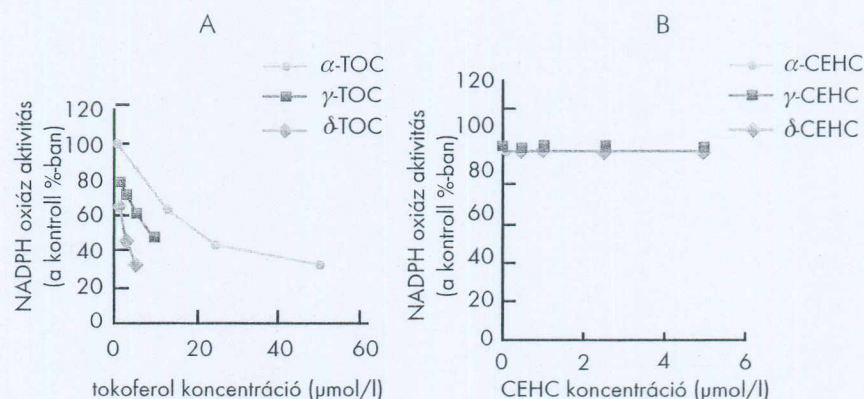
EREDMÉNYEK

Eredményeink szerint mindhárom tokoferol homológ (2a. ábra) és vízoldható metabolit (2b. ábra) gátolta a humán neutrofilek PMA stimulálta szuperoxid anion termelését. Az ábrákon bemutatott adatok egyértelműen mutatják, hogy az egyes homológok és vízoldható metabolitok hatásosságában különbség van. Fiziológias koncentrációknál a γ - és a δ -homológok (tokoferolok és CEHC metabolitok esetében egyaránt) nagyobb mértékű szuperoxid anion termelés csökkenést eredményeztek, mint az α -homológok az in vitro kísérletekben. Fontosnak tartjuk megjegyezni, hogy vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy egyes egyének neutrofileiben nagy koncentrációban adott α -tokoferol (>40 µmol/l) fokozta a PMA stimulálta szuperoxid anion termelést (3. ábra). Az ellent-

4. ÁBRA: TOKOFEROLOK (A) ÉS VÍZOLDHATÓ METABOLITJAIK (B) HATÁSA A PKC AKTIVÁCIÓJÁRA FORBOL-ÉSZTER STIMULÁLTA HUMÁN NEUTROFILEKBEN



5. ÁBRA: TOKOFEROLOK (A) ÉS VÍZOLDHATÓ METABOLITJAIK (B) HATÁSA AZ AKTIVÁLT NADPH-OXIDÁZ SZUPEROXID ANION TERMELŐ KÉPESSÉGÉRE



mondásos eredmény tisztázására, meghatároztuk a neutrofil szeparálásával egyidejűleg, a vizsgálatban résztvevők plazma tokoferol szintjeit is. Azt találtuk, hogy azokban az egyénekben, akiknek a neutrofileiben az α -tokoferol 40 µmol/l feletti koncentrációban, in vitro, pro-oxidáns hatású volt, magasabb plazma α -tokoferol szinttel (~50 µmol/l) rendelkeztek, mint azok, akikben az α -tokoferol minden koncentrációnál gátolta a neutrofilek szuperoxid anion termelését. Ez az eredményünk rámutat arra, hogy a kontrollálatlan, nagy mennyiségben bevitt α -tokoferol kedvezőtlen – pro-oxidáns – hatású lehet, in vivo is.

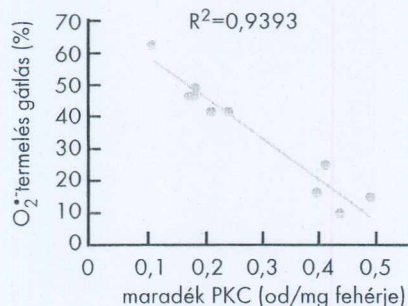
A következő lépésben megvizsgáltuk a tokoferolok és a vízoldható metabolitok hatását a PKC-aktiválásra. Azt találtuk, hogy valamennyi vegyület gátolta a PKC-aktivitást és transzlokációt, azaz emelkedett a citoszolban a maradék PKC-aktivitás. A hatás maximuma általában a tokoferolok (4a. ábra) és vízoldható metabolitjaik (4b. ábra) fiziológias koncentrációjánál – az α -tokoferolnál 25 µmol/l, a γ -tokoferolnál 2-3 µmol/l és δ -tokoferol ese-

tében 1 µmol/l – koncentrációnál alakult ki. Az eredmények azt is mutatják, hogy az α -tokoferol gátolta legkevésbé a PKC-aktivitást. A metabolitok és anyavegyületek hatásosságát összevetve megállapíthatjuk, hogy a vízoldható metabolitok nagyobb PKC-gátló képességgel rendelkeztek (0,9 o.d./mg protein vs. 0,5 o.d./mg protein), mint az anyavegyületek, és a γ - és δ -CEHC hatásosabban gátolta a PKC-aktivitást, mint az α -CEHC (4b. ábra).

Különbséget találtunk a tokoferolok és CEHC-vegyületek aktivált NADPH-oxidáz O₂⁻ termelő képességére kifejtett hatásában. Míg mindhárom tokoferol homológ gátolta (5a. ábra) az aktivált NADPH-oxidáz O₂⁻ termelést, addig a vízoldható metabolitok egyikének sem volt gátló hatása (5b. ábra). A tokoferolok esetében a NADPH-oxidázra a következő IC₅₀ értéket kaptunk: α -tokoferol 24,5 µmol/l, γ -tokoferol 8,9 µmol/l és δ -tokoferol 2,9 µmol/l.

Szoros összefüggést találtunk azonban a citoszolban mért maradék PKC-aktivitás és a szuperoxid anion termelés között (6. ábra), amely azt mutatja,

6. ÁBRA: LINEÁRIS KAPCSOLAT VAN A FORBOL-ÉSZTER STIMULÁLTA NEUTROFILEK SZUPEROXID ANION TERMELÉSE ÉS A MARADÉK PKC-AKTIVITÁS KÖZÖTT

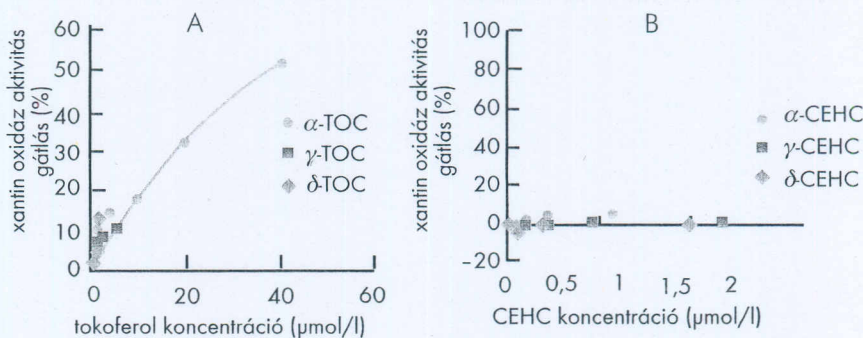


hogy intakt neutrofilekben a tokoferoloknak és a vízoldható metabolitoknak nem a NADPH-oxidázra kifejtett hatása, hanem a PKC-aktiválásra kifejtett gátló hatása a domináns. Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a PKC-ra kifejtett hatás szempontjából a tokoferolon található fitil-oldallánc hiánya fokozza a gátlóképességet, míg a NADPH-oxidázra kifejtett hatás szempontjából a fitil-oldallánc hiánya a gátló hatás elvesztését eredményezi. Xantin/xantin-oxidáz rendszerben vizsgáltuk az anyagok közvetlen szuperoxid anion gyökfogó képességét, amelyhez először a húgysavképződésre kifejtett hatást (7a. és b. ábra), majd a citokróm C redukcióra kifejtett hatást határoztuk meg. Eredményeink szerint a tokoferolok közepes erősségű xantin-oxidáz gátló hatásúak (IC₅₀ ~ 40 μmol/l) és nincs különbség a homológok hatásában (7a. ábra). Ugyanakkor a metabolitok egyike sem rendelkezik xantin-oxidáz aktivitást gátló képességgel (7b. ábra). Összehasonlítva a húgysavképződésre, illetve a citokróm C redukcióra kifejtett hatást (8a. és b. ábra), láthatjuk, hogy mindkét esetben a citokróm C görbéje a húgysav-képződés görbéje fölött fut, azaz egyik anyag sem rendelkezik direkt O₂^{•-} gyökfogó tulajdonsággal. Kismértékű citokróm C redukció növekedést észleltünk a vízoldható metabolitok esetében, ha az alkalmazott koncentráció a fiziológiai koncentrációnál magasabb volt.

MEGBESZÉLÉS

Jelen vizsgálatunkban igazoltuk, hogy minden tokoferol homológ és CEHC-metabolit gátolta humán neutrofilek-

7. ÁBRA: TOKOFEROLOK (A) ÉS VÍZOLDHATÓ METABOLITJAIK (B) HATÁSA A XANTIN-OXIDÁZ AKTIVITÁSÁRA



ben a O₂^{•-} termelést, a hatásért a PKC-aktivitásra kifejtett gátló hatás felelős, azonban a különböző metilált-ságú homológok hatásossága eltérő. Mind a tokoferolok, mind a CEHC-metabolitok esetében, a hipometilált γ- és δ-homológ hatásosabb gátló, mint az α-homológ. Eredményeink szerint fiziológiai koncentrációban a CEHC-vegyületek gátló képessége meghaladja az anyavegyületekét. Ezek az eredmények összhangban vannak azokkal a megfigyelésekkel, amelyek a CEHC-vegyületek biológiai szerepét igazolják. A CEHC-vegyületek, ebben a kis koncentrációban (nmol nagyságrend) képesek jelátviteli utak és ennek következtében, metabolikus folyamatok megváltoztatására, mint pl. sejt differenciálódás, gyulladásos folyamatok és oxigén-metabolizmus (18-20).

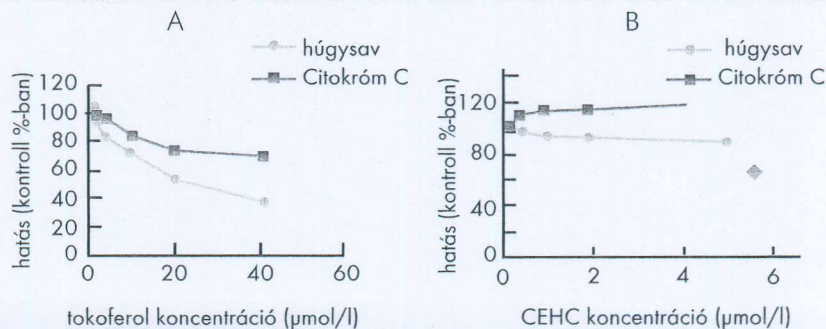
A másik fontos eredményünk a γ-homológok kiemelt szerepét bizonyítja. Igazoltuk, hogy mind a γ-tokoferol, mind a γ-CEHC hatásosabb az α-homológnál. Ennek egyik lehetséges magyarázata lehet az, hogy a különböző homológok extracelluláris térből történő beépülése különböző mértékű. Az extracellulárisan adott γ- és δ-tokoferol nagyobb hányadban épül be a sejtek-

be, mint az α-tokoferol (14, 33, 34). A membránba beépülés, amelyben a hipometilált homológok előnyt élveznek, a sejtmembrán szerkezetében olyan változásokat hozhatnak létre, amelyek a PKC membránhoz való kötődését gátolják. Természetesen nem hagyható figyelmen kívül az sem, hogy a vizsgált vegyületek magával a PKC-vel is kölcsönhatásba léphetnek, és ebben a folyamatban a hipometilált formák térszerkezete előnyt jelenthet a metilált α-formához képest.

Eredményeink továbbá azt is mutatják, hogy a fitil-oldallánc hiánya, ami a CEHC-homológokra jellemző, előnyösebb térszerkezet biztosít a PKC-gátlás szempontjából, azaz a CEHC-vegyületek nagyobb mértékű gátlást eredményeztek a PKC transzlokációjában, mint az anyavegyületek. Ez a megfigyelés inkább az anyagok PKC-vel való kölcsönhatásának lehetőségét támasztja alá, hiszen a CEHC-vegyületek vízoldhatóak, így a membránba való beépüléstől esetünkben eltekinthetünk. A mechanizmus vizsgálata folyamatban van.

A neutrofilekben a szuperoxid aniont a NADPH-oxidáz termeli. A NADPH-oxidáz, egy több kompenzából álló

8. ÁBRA: ÖSSZEFÜGGÉS A XANTIN/XANTIN-OXIDÁZ RENDSZERBEN A HÚGYSAVKÉPZŐDÉS ÉS A CITOKRÓM C REDUKCIÓ KÖZÖTT TOKOFEROLOK (A) ÉS VÍZOLDHATÓ METABOLITJAIK (B) ESETÉBEN



enzim, amelynek citoszolikus (phox-proteinek) és membrán-kötött (Citokróm B558; Rac1/2) alegységei vannak. Stimulációt követően a PKC aktiválódása vezet a NADPH-oxidáz citoszolikus alegységeinek a foszforilálódásához (p40phox, p47phox, p67phox), majd ezek az alegységek a membránba transzlokálódnak és hozzákapcsolódnak a flavoproteinhez (35, 36). Ezt követően a $O_2^{\cdot-}$ termelés akkor indul be, ha a Rac1 vagy 2 típusú, GTP-áz aktivitással rendelkező protein, is hozzákapcsolódik az enzim többi részéhez (37). Több olyan természetes eredetű antioxidáns ismert, amely direkt NADPH-oxidáz gátló képességgel rendelkezik (23, 24, 38). Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a tokoferolok mindegyike gátolja az aktivált NADPH-oxidáz $O_2^{\cdot-}$ termelő képességét, míg a CEHC-vegyületek egyikének sem volt hatása. Ennek alapján megállapíthatjuk, hogy a fitiloldallánc hiánya, amely feltehetőleg a molekula izolált sejtmembránhoz való kötődésének kialakulásához szükséges, vezet az aktivitás elvesztéséhez. A NADPH-oxidáz nemcsak a fagocitasejtekben fordul elő, hanem pl. az érfalban is. Korrelációt mutattak ki az enzimaktivitás és mRNS-expresszió,

valamint az ateroszklerózis konvencionális rizikó-faktorai között (39-41). A nem-fagocita NADPH-oxidázokban az enzim aktiválódása PKC-független módon is létrejöhethet, így a molekulák direkt NADPH-oxidáz gátló képessége inkább ezekben a folyamatokban bírhat jelentőséggel.

Igazoltuk azt is, hogy sem a tokoferolok, sem a CEHC-vegyületek nem rendelkeznek $O_2^{\cdot-}$ gyökfogó képességgel. Mindezek alapján, megállapíthatjuk, hogy a tokoferolok és CEHC-vegyületek esetében a neutrofilek $O_2^{\cdot-}$ termelésének gátlása a molekulák PKC-aktiválásra kifejtett gátló hatásának tulajdonítható. Az aktivált NADPH-oxidázra és a xantin-oxidáz aktivitására kifejtett gátló hatás csak másodlagos, azonban az összantioxidáns hatás szempontjából lényeges elem.

Meg kell említenünk a magas plazma α -tokoferol koncentrációkkal rendelkező egyének neutrofiljein, nagy koncentrációjú α -tokoferol hozzáadás után, talált pro-oxidáns hatást. Ez a megfigyelésünk összhangban áll Kontush és mtsai megfigyelésével (42). Azt találták ugyanis, hogy a nagy koncentrációjú α -tokoferol pro-oxidánsként viselkedett olyan izolált LDL-min-

táknál, amelyekben nagy volt eredetileg az α -tokoferol tartalom, függetlenül attól, hogy az oxidatív módosulást rézzel vagy más módon hozták létre. Feltételezésük szerint, ez azzal magyarázható, hogy ilyen körülmények között, megnő az α -tokoferoxil-gyök élettartama, amely pro-oxidáns hatást eredményez (42). Természetesen további vizsgálatok szükségesek annak igazolására, hogy in vivo milyen folyamatok jönnek létre nagy dózisú szupplementáció során. Kétségtelen azonban, hogy ez a két megfigyelés magyarázhatja, hogy az irodalmi adatok miért mutatnak olyan nagy különbségeket az α -tokoferol szupplementációs vizsgálatokban a kardiovaszkuláris mortalitás és morbiditás szempontjából (3-6).

Összefoglalva eredményeinket, megállapíthatjuk, hogy a szervezet teljes antioxidáns védekezőképessége szempontjából az összes E-vitamin-vegyületet és metabolitjaikat együttesen számításba kell venni.

Köszönetnyilvánítás: A kutatást az OTKA Bizottság támogatta (T 42550). A közlemény megjelent a *Journal of Nutritional Biochemistry* (33) című folyóiratban.

IRODALOM

- Packer L, Obermuller-Jevic UC. Vitamin E: An Introduction. The Antioxidant Vitamins C and E. ed. Champaign, AOCSS Press IL USA; 2002. 133.
- Brigelius-Flohe R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 1999; 13: 1145-1155.
- Rimm EB, Stampfer MJ, Ascheriom A, et al. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993; 328: 1450-1456.
- Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, et al. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med* 1993; 328: 1444-1449.
- Albert CM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, et al. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA* 1998; 279: 23-28.
- Bleys J, Miller ER, Pastor-Barriuso R, et al. Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2006; 84: 880-887.
- Hiramatsu K, Arimori S. Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. *Diabetes* 1988; 37: 832-837.
- Ludwig PW, Hunninghake DB, Hoidal JR. Increased leukocyte oxidative metabolism in hyperlipoproteinemia. *Lancet* 1982; 2: 348-352.
- Chan SS, Monteiro HP, Schindler F, et al. Alpha-tocopherol modulates tyrosine phosphorylation in human neutrophils by inhibition of protein kinase C activity and activation of tyrosine phosphatases. *Free Radic Res* 2001; 35: 843-856.
- Venugopal SK, Devaraj S, Yang T, et al. Alpha-tocopherol decreases superoxide anion release in human monocytes under hyperglycemic conditions via inhibition of protein kinase C-alpha. *Diabetes* 2002; 51: 3049-3054.
- Jiang Q, Christen S, Shigenaga MK, et al. Gamma-tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *Am J Clin Nutr* 2001; 74: 714-722.
- Devaraj S, Traber MG. Alfa-tocopherol. The new vitamin E? *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 530-531.
- Wagner KH, Kamal-Eldin A, Elmadfa I. Gamma-Tocopherol - An Underestimated Vitamin? *Ann Nutr Metab* 2004; 48: 169-188.
- Galli F, Lee R, Atkinson J, et al. Gamma-tocopherol biokinetics and transformation in humans. *Free Radic Res* 2003; 37: 1225-1233.
- Liu M, Wallmon A, Olsson-Mortlock C, et al. Mixed tocopherols inhibit platelet aggregation in humans: potential mechanism. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 700-706.
- Jiang Q, Elson-Schwab I, Courtemanche C, et al. Gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11494-11499.
- Isnardy B, Wagner KH, Elmadfa I. Effects of alpha-, gamma-, and delta-tocopherols on the autoxidation of purified rapeseed oil triacylglycerols in a system containing low oxygen. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 7775-7780.
- Betancor-Fernandez A, Sies H, Stahl W, et al. In vitro antioxidant activity of 2,5,7,8-tetramethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman (alpha-CEHC), a vitamin E metabolite. *Free Radic Res* 2002; 36: 915-921.
- Galli F, Piroddi M, Jannone A, et al. A comparison between the antioxidant and peroxynitrite-scavenging functions of the vitamin E metabolites - and -carboxyethyl-6-hydroxychromans. *Int J Vit Nutr Res* 2004; 74: 362-373.

20. Galli F, Stabile AM, Betti M, et al. The effect of alpha- and gamma-tocopherol and their carboxyethyl hydroxychroman metabolites on prostate cancer cell proliferation. *Arch Biochem Biophys* 2004; 423: 97–102.
21. Betti M, Minelli A, Canonico B, et al. Antiproliferative effects of tocopherols (vitamin E) on murine glioma C6 cells: homologue-specific control of PKC/ERK and cyclin signaling. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 364–372.
22. Hensley K, Benaksas EJ, Bolli R, et al. New perspectives on vitamin E: gamma-tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1–15.
23. Varga Z, Seres I, Nagy E, et al. Structures prerequisite for antioxidant activity of silybin in different biochemical systems in vitro. *Phytomedicine* 2006; 13: 85–93.
24. Varga Z, Nagy E, Katko M, et al. Relationship of structure and antioxidant activity of synthetic silybin-derived molecules: identification of molecular structure responsible for antioxidant activity employing various models for inducing oxidative stress. 6. fejezet *New Developments in Antioxidant Research* Ed. Panglossi HV Nova Science Publishers Inc; 2006. 113–151.
25. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21: 77–89.
26. Ruperez FJ, Barbas C, Castro M, et al. Simplified method for Vitamin E determination in rat adipose tissue and mammary glands by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1998; 823: 483–487.
27. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JJ. Biological defense mechanism. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 1970; 52: 791–794.
28. Varga Z, Czompa A, Kakuk G, et al. Inhibition of superoxide anion release and hydrogen peroxide formation in PMNLs by flavonolignans. *Phytother Research* 2001; 15: 608–12.
29. Varga Z, Czompa A, Újhelyi L, et al. Effect of silybin on phorbol myristate acetate-induced protein kinase C translocation, NADPH oxidase activity, and apoptosis in human neutrophils. *Phytomedicine* 2004; 11: 206–212.
30. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr A, et al. Protein measurement with folin reagent. *J Biol Chem* 1951; 125: 265–273.
31. Jones OT, Hancock JT. Assays of plasma membrane NADPH oxidase. *Methods in Enzymology* (Ed. Lester Packer Acad. Press) 1994; 233: 222–229.
32. Sheu SY, Lai CH, Chiang HC. Inhibition of xanthine oxidase by purgallin and silymarin group. *Anticancer Res* 1998; 18: 263–267.
33. Varga Z, Kosaras E, Komodi E, et al. Effects of tocopherols and 2,2'-carboxyethyl hydroxychromans on phorbol-ester stimulated neutrophils. *J Nutr Biochem* 2008; 19: 320–27.
34. Tran K, Chan AC. Comparative uptake of alpha- and gamma-tocopherol by human endothelial cells. *Lipids* 1992; 27: 38–41.
35. Nixon JB, McPhail LC. Protein kinase C (PKC) isoforms translocate to Triton-insoluble fraction in stimulated human neutrophils: Correlation of conventional PKC with activation of NADPH oxidase. *J Immunol* 1999; 163: 4574–4582.
36. Dusi S, Della Bianca V, Grzeskowiak M, et al. Relationship between phosphorylation and translocation to the plasma membrane of p47phox and p67phox and activation of the NADPH oxidase in normal and Ca(2+)-depleted human neutrophils. *Biochem J* 1993; 290: 173–298.
37. Bokoch GM, Zhao T. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1533–1548.
38. Chen X, Touyz RM, Park JB, et al. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* 2001; 38: 606–611.
39. Guzik TJ, West NE, Black E, et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 2000; 86: E85–90.
40. Sorecu D, Weiss D, Lassegue B, et al. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1429–1435.
41. Guzik TJ, Sadowski J, Kapelak B, et al. Systemic regulation of vascular NAD(P)H oxidase activity and nox isoform expression in human arteries and veins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1614–1620.
42. Kontush A, Finckh B, Karten B, et al. Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J Lipid Res* 1996; 37: 1436–1448.