

A torma (*Armoracia rusticana*) antifungális hatóanyagainak vizsgálata *in vitro*

Doktori tézisek

Bertóti Regina Lilla

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Szőke Éva, D.Sc., ny. egyetemi tanár
Dr. Vasas Gábor, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Mészáros Annamária, Ph.D., tud. munkatárs
Dr. Leiter Éva, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Klebovich Imre, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Láng Orsolya, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Droppa Magdolna, D.Sc., egyetemi docens
Dr. Hajdú Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2019

BEVEZETÉS

A Brassicaceae családba tartozó torma (*Armoracia rusticana* P. Gaertner, B. Meyer & Scherbius) fűszerezési és gyógyászati felhasználásáért is az izotiocianát (ITC) tartalmú illóolaja a felelős. Az ITC-ok a glükozinolátok (GLS, béta-tioglukozid-N-hidroxiszulfátok) hidrolitikus bomlástermékei. A reakciót a mirozináz (MYR, béta-tioglikozid glükohidroláz) enzim katalizálja. A MYR mirozin sejtekben tárolódik a növényben, amikor a növényi szövet megsérül (pl. reszelés, rágás) a MYR kapcsolatba kerül a GLS-okkal, mely eredményeként bioaktív izotiocianátok, nitrilek, tiocianátok, epitionitrilek vagy oxazolidinok keletkeznek a reakciókörülmények függvényében. A torma illóolaj fő komponensei az allil-izotiocianát (AITC) és a fenetil-izotiocianát (PEITC).

Az ITC-ok széleskörű terápiás hatásai közül a legkiemelkedőbb az antikarcinogén és az antimikrobiális hatás, antibakteriális és antifungális hatása is jelentős. A gombaellenes hatásmechanizmusról kevesebb információ állt rendelkezésünkre. Egyéb gyógyászati felhasználásuk többek között a következő betegségekben is ígéretes: gyulladások, vérlemezke aggregáció gátlás, autizmus, cukorbetegség okozta szívizom elégtelenség, stb.

A torma nagy mennyiségben tartalmazza a torma peroxidáz enzimet is, melyet számos molekuláris biológiai módszerben alkalmaznak, pl. vér glükóz és koleszterin szint mérésében.

A növényi biotechnológiai úton előállított hairy root kultúrák (HRC) létrehozásához a növényi szövetet *Agrobacterium rhizogenes*-szel (hajszálgöykeresedést okozó talajbaktérium) fertőzik meg. A baktérium Ri (gyökérindukáló) plazmidjában található transzfer-DNS képes integrálódni a növényi genomba, mely következtében a szekunder metabolitok szintézisében is változás következhet be. A hormon mentes táptalajon is korlátlan növekedésű hairy root klónok genetikailag stabilak, alkalmasak másodlagos anyagcseretermékek termeltetésére (pl. gyógyszerek, ízanyagok). A géntaszformáció következtében a másodlagos anyagcseretermékek szintézise eltérhet az eredeti növényétől.

CÉLKITŰZÉS

1. A torma (*Armoracia rusticana*) hairy root vonalak létrehozása, enzim- és hatóanyag mintázatának vizsgálata

- a) biológiailag aktív vegyületek, valamint enzimatis variabilitásuk: a GLS-MYR-ITC rendszer és a torma peroxidáz tartalom és aktivitás tanulmányozása.
- b) A különböző növényi szervekből (levél lemezből és levélnyélből) létrehozott genetikai vonalak összehasonlítása a fent említett tulajdonságok alapján.

1. A torma illóolaj antifungális hatás mechanizmusának a feltérképezése

- a) A vizsgálatokhoz a fonalas gombák közé tartozó, tüdő aszpergillózist okozó humán patogén *Aspergillus fumigatus*-t, valamint apatogén modell szervezet párját, az *Aspergillus nidulans*-t; ill. a kandidiázisért felelős humán patogén sarjadzó gomba *Candida albicans*-t és apatogén modell szervezetként a *Saccharomyces cerevisiae*-t választottuk.
- b) A torma illóolaj hatásának igazolása folyékony és illékony közegben.
- c) A hatásmechanizmus felderítéséhez *Candida albicans*-on vizsgáltuk a torma illóolaj, ill. az AITC és PEITC sztenderdek hatását.
- d) Az oxidatív stressz hatás hipotézisünk igazolásához célunk volt a torma illóolaj különböző oxidatív stresszt kiváltó antifungális szerekllel való interakciós vizsgálata, valamint az oxidatív stresszválaszban szerepet játszó molekulák, ill. enzimek szintjének molekuláris analízise.

MÓDSZEREK

1. Hairy root kultúrák létrehozása, valamint enzim- és hatóanyagtartalmuk vizsgálata

a) Növényi anyagok, in vitro kultúrák, transzformáció

Azobolus rusticana felületileg sterilizált levélnyelének és levéllemezőnek transzformálása *Agrobacterium rhizogenes* A4 törzsszel, az így létrehozott hairy root kultúrák felszaporítása folyékony Murashige-Skoog táptalajban történt.

b) A géntranszformáció igazolása polimeráz láncreakcióval

A géntranszformáció igazolása a genetikailag különböző hairy root klónok DNS izolálását követően polimeráz láncreakcióval (PCR), a bakteriális *RolC* gén kimutatása pozitív (*A. rhizogenes*ből izolált DNS) és negatív (az anyanövény leveléből izolált DNS) kontrol mellett.

c) Biomassza produkció

Meghatározása a friss tömeg, száraz tömeg (liofilizált minták), szárazanyag tartalom, napi növekedési index alapján történt. A morfológiai jellemzőket, úgymint elágazó képesség, járulékos hajtás képzés, vizuálisan értékeltük.

d) Folyadék kromatográfiás-elektrospray ionizációs-tömegspektrometriás vizsgálatok

A 4 hetes, liofilizált minták vizes kivonatainak kvalitatív és kvantitatív méréseit szárazanyag tartalomra vonatkoztatva végeztük.

Reverz, magas fázisú folyadékkromatográfia (RP-HPLC): Agilent 1100 HPLC rendszert (Santa Clara, CA, USA) alkalmaztunk; oszlop: Zorbax SB-C18 (150 × 3,0 mm; I.d 3,5 μm), 30 °C-on tartva; eluensek: A: 0,1% hangyasav, B: metanol; 0–30 perc: eluens B 10%-tól 40%-ig; 30–31 perc: eluens B 40%-tól 100%-ig; 31–37 perc: eluens B 10%; áramlási sebesség: 0,3 ml/perc; injektálási mennyiség: 5 μl.

ESI-MS/MS: Agilent 6410 Tripla Quadrupole készüléken Electrospray ion forrást alkalmaztunk, a méréseket negatív ion módban végeztük.

A kvantitatív mérésekhez GLN és SIN sztenderdek 4-4 pontos kalibrációját alkalmaztuk 0,066-33,333 μg/ml tartományban.

e) Gáz kromatográfiás-tömegspektrometriás vizsgálatok

Az illékony ITC-ok, nitrilek kvalitatív és kvantitatív analízisét a 4 hetes friss minták acetonos kivonatokból szárazanyag tartalomra vonatkoztatva végeztük.

Gázkromatográfiás-tömegspektrometria (GC-MS): Az injektálás split módban történt (15:1 split arány), injektálási mennyiség: 2 μl. A GC-MS analízist Agilent 6890 GC műszerrel végeztük, 5973N tömeg szelektív detektorral, és Chrom Card Server Ver.1.2. szoftverrel felszerelve. Kapilláris oszlop: 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, SLB-5ms 5% fenil-metil sziloxán. Vivő gáz: He. Áramlási sebesség: 1,6 ml/perc. Hőmérséklet program: 50°C (3 perc); 15 °C/perc emelkedéssel 200 °C-ig (2 perc); 40 °C/perc emelkedéssel 280 °C-ig (1 perc).

Analízis: 18 perc. MS körülmények: 70 eV ionizációs energia, 40–500 m/z tömeg tartomány (scan mód). Az azonosítás a NIST 05 könyvtár-, és irodalmi adatokon, valamint autentikus sztenderdekkel (PEITC és AITC) való összehasonlításon alapult. A fő komponenseket a teljes ion kromatogramból integráltuk ki, a minor komponensek pedig szelektív ion monitorizálás módban. Négy pontos kalibrációs egyenest készítettünk az AITC és PEITC sztenderdekből, 0,00976 μg/ml és 1,25 μg/ml tartományban. Mindhárom biológiai ismétlés mérési sorozatát kalibrációval kezdtük.

f) A mirozináz aktivitás vizsgálata gélelektroforézissel

A mirozináz aktivitás vizsgálatát natív poliakrilamid gélelektroforézissel (5,7% gyűjtő/felső gél és 10 vagy 7,5% szeparáló/alsó gél) 4 hetes minták Na-foszfát pufferes kivonataiból, egységnyi fehérjére vonatkoztatva végeztük. Előhíváshoz szinigrin tartalmú metilvörös indikátort alkalmaztunk. A kiértékelést CP Atlas 2.0 gélkép feldolgozó szoftverrel végeztük

g) Peroxidáz tartalom és aktivitás

A peroxidáz tartalom és aktivitás vizsgálatát gélelektroforézissel és spektrofotometriával, pirogallol és gvajakol szubsztrátokkal, egységnyi fehérjére vonatkoztatva végeztük.

h) Statisztikai analízis

Multivariábilis statisztikai elemzéssel az összes vizsgált jellemző közötti pozitív és negatív korrelációkat vizsgáltuk a következő módszerekkel: főkomponens analízis, hierarchikus klaszterezés, hőtérkép.

2. A torma illóolaj antifungális hatása és hatásmechanizmusa:

a) Antifungális kísérletek során vizsgált izotiocianátok

Torma illóolaj: KELET PRODUKT Zrt., AITC: Sigma, PEITC: Sigma.

b) Antifungális kísérletek során alkalmazott gomba törzsek

Aspergillus fumigatus AF293, *A. nidulans* FGSCA4, *Candida albicans* SC5314, *Saccharomyces cerevisiae* S288C (a Debreceni Egyetem Mikrobiális Biotechnológiai Tanszék törzsgyűjteményéből).

c) A torma illóolaj antifungális hatásának vizsgálata

A torma illóolaj antifungális aktivitását teszteltük légtérbe párologtatva (Petri-csészében) és folyadék kultúrában MTT-teszttel (MTT-formazán képződés detektálása 550 nm-en) 50%-os növekedésgátló értékeket határoztunk meg mind a 4 vizsgált gomba törzsre.

d) „Time-kill assay”

A fungicid vagy fungisztatikus hatás felderítése. 20 ml-es YPD tápközeget tartalmazó *C. albicans* kultúrákon. A tenyészeteket 37 °C-on, 140 rpm-en inkubáltuk, amíg az OD₆₄₀ elérte a 0,6-0,7-es értéket (kiindulási OD₆₄₀ = 0,1). A kultúrákat a különböző koncentrációjú torma illóolaj-YPD (0-25 µl/ml) oldatokkal kezeltük, a változásokat az OD₆₄₀ értékeken keresztül követtük. A tenyészeteket tovább inkubáltuk 37 °C-on és 140 rpm-en 24 órán keresztül. A kezeléstől számított 0, 3, 6, 9, 12 és 24 óra időpontokban mintákat vettünk az élő sejtszám meghatározásához, majd YPD-agar táptalajra szélesztettük. A tenyészeteket 37 °C-on 1 napig inkubáltuk, majd a telepeket megszámloltuk.

e) Analitikai vizsgálatok molekuláris biológiai módszerekkel

C. albicans sejeket YPD tápközegben, 37 °C-on, 140 rpm-en tenyésztettük OD₆₄₀ = 0,6-os értékig, a tenyészeteket 0-2,5 µl/ml torma illóolaj-YPD oldattal kezeltük, majd 3 órával a kezelés után mintát vettünk. A szuperoxid képződés méréséhez a kultúrákat 3 órával az illóolaj-YPD kezelést követően dihidroetídiummal kezeltük, és a képződött etídiumot (Et)

detektáltuk. A GSH, GSSG tartalmakat és a specifikus enzim aktivitásokat 3 órával a kezelést követően detektáltuk. A kísérletet AITC-al és PEITC-al is elvégeztük.

A sejtek szuperoxid tartamán kívül mértük a kataláz, szuperoxid diszmutáz (SOD), glutation reduktáz (GR), glutation-S-transzferáz (GST) és glutation peroxidáz (GPx) enzimek szintjét.

A minták glutation (GSH) és oxidált glutation (GSSG) tartamát NADPH-GR-DTNB teszttel határoztuk meg.

f) A torma illóolaj és GSH, GSSG vagy GR közötti reakciók tanulmányozása in vitro

A torma illóolaj és redukált- és oxidált glutation, vagy glutation reduktáz közötti *in vitro* reakciók vizsgálata. GSH-t (50 mM), GSSG-t (50 mM) vagy GR-t (35 U/ml) inkubáltunk 0,1 M Na-foszfát pufferban (pH = 7,5) 1 µl/ml torma illóolajal vagy nélkül, 0,5 órán keresztül, szobahőmérsékleten. Az inkubációt követően a minták GSH és GSSG tartalmát, valamint GR aktivitását határoztuk meg NADPH-GR-DTNB teszttel.

g) A torma illóolaj és diamid, menadion-Na-biszulfid (MSB) és a kloro-dinitrobenzol (CDNB) interakciójának vizsgálata

Az interakciókat 1 ml YPD tápközegben *C. albicans* sejteken 37 °C-on, 1 napos tenyésztéssel végeztük. 1-1 ml YPD tápközéget kiegészítettünk 0; 0,13 vagy 0,25 µl/ml torma illóolaj-YPD-vel és/vagy 9,6 vagy 16 µM MSB-vel, 6 vagy 10 µM diamiddal, 0,03 vagy 0,06 µM CDNB-vel és 1×10^4 számú *C. albicans* sejttel inokuláltuk. Mindegyik kultúrát 37 °C-on 1 napig inkubáltuk. A növekedés mértékét az optikai denzitás mérésével határoztuk meg 640 nm-en. Interakciós rátát (IR) számítottunk az Abbott formulával: $IR = I_o/I_e$, ahol I_o a mért és I_e a vélt százalékos növekedés gátlás, melyet a két tesztelt komponens együttesen okoz. $I_e = X_1 + X_2 - (X_1 X_2 / 100)$, ahol $X_{1,2}$ jelenti a két tesztelt komponens egyenkénti növekedés gátló hatását. $IR > 1,5$ érték szinergista, $1,5 > IR > 0,5$ additív, és $IR < 0,5$ antagonist interakciót jelent.

EREDMÉNYEK

1. Hairy root kultúrák létrehozása, valamint enzim- és hatóanyagtartalmuk vizsgálata

Az 50 izolált HRC vonalból 21 volt életképes; 11-et a levéllemez fertőzéséből (ArLB), 10-et pedig a levélnyel inokulálásából (ArP) izoláltunk. Az összes életképes vonalat az *A. rhizogenes* A4 törzsszel való fertőzéssel hoztuk létre.

A HRC-kba beépült bakteriális *RolC* gén jelenlétét minden klón esetében megerősítettük PCR analízissel. Pozitív kontrollként az *A. rhizogenes* A4 törzs DNS-ét, negatív kontrollként az anyanövény DNS-ét alkalmaztuk.

A jellegzetes fragmensek alapján, hét GLS-ot azonosítottunk a HRC-k vizes kivonatából, melyek a következők: szinigrin, glükoiibererin, glükoiбарin, glükobrasszicin, glükonaszturtiin, 4-metoxi-glükobrasszicin vagy neoglükobrasszicin, glükaorabishirsutain. Szinte minden HRC-ban a glükonaszturtiin volt a főkomponens. A kvantitatív mérési eredményeket a multivariábilis statisztikai elemzéshez használtuk fel.

Annak ellenére, hogy 7 GLS-ot detektáltunk, bomlástermékek közül mindössze 3 ITC-ot (AITC, 3-metilti-izotiocianát, PEITC), és 2 nitrilt tudtunk azonosítani, melyek közül a 3-fenilpropionitril a fő GLS, a glükonaszturtiin hidrolitikus bomlásterméke. A kvantitatív mérési eredményeket a multivariábilis statisztikai elemzéshez használtuk fel.

A GLS és bomlástermékek eltérő jelenlétének a hátterében a HRC-k különböző MYR enzim mintázata állhat. Az ArP (HRC-k a levélnyélből) és ArLB (HRC-k a levéllemezből) csoportokba tartozó HRC-k látható variabilitást mutattak. A 2. MYR izoenzim szinte minden klónban jelen volt, néhány HRC (ArLB113, ArLB116, ArP23) pedig 3 izoenzimet is tartalmazott. Az ArLB klónok láthatóan nagyobb mirozináz aktivitást mutattak.

A HRC-k torma peroxidáz vizsgálata során két alkalmazott módszer (gél analízis és spektrofotometria) összevethető eredményeket adott mindkét vizsgált szubsztráttal (pirogallol, gvajakol), a korrelációs értékek 0,70 fölött voltak ($p < 0,001$). A géleken 5 izoenzim volt látható.

A multivariábilis statisztika főkomponens analízise alapján megállapítottuk, hogy az inokulált szerv meghatározza a HRC-k tulajdonságait. Box-plot analízissel szemléltettük, az ArLB és ArP HRC csoportok vizsgált tulajdonságai közötti számos szignifikáns különbséget (pl. DGI, szinigrin, 3-fenilpropionitril, peroxidáz aktivitás, stb.) Valamennyi esetben az ArLB csoport vonalai rendelkeztek magasabb értékkel. A 2. MYR izoenzim aktivitása 3-fenilpropionitrillel pozitív, ezzel szemben 3-metiltiopropil-izotiocianáttal negatív korrelációt mutatott.

2. A torma illóolaj antifungális hatásának, ill. hatásmechanizmusának vizsgálata

Kísérleteinkben a torma illóolaj figyelemre méltó antifungális hatását tapasztaltuk légtérbe párologtatva *Saccharomices cerevisiae*-n és *Aspergillus nidulans*-on, valamint a humán patogén *Candida albicans*-on és *A. fumigatus*-on tesztelve. A tiszta illóolaj hatásosabb volt, mint azonos mennyiségben YPD tápközegben hígítva. A torma illóolaj folyadék

kultúrákhoz adagolva is erős antifungális hatást mutatott. Az 50%-os növekedésgátló értékek rendre 5, 6, 10 és 13 μ l torma illóolaj-YPD/ml tápközeg értékűnek bizonyultak *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *A. nidulans* valamint *A. fumigatus* esetében.

A torma illóolaj, hasonlóan a főkomponenseihez (AITC és PEITC) nagymértékben gátolta a *C. albicans* kultúrák növekedését. Annak ellenére, hogy a torma illóolaj, AITC és PEITC antifungális aktivitása hasonlóan bizonyult, a növekedést gátló hatás a torma illóolaj esetében szignifikánsan magasabb volt, mint az AITC vagy PEITC hatására. Az AITC erősebb gátló hatást mutatott, mint a PEITC.

Time-kill assay-vel demonstráltuk, hogy a torma illóolaj inkább fungicid (fungitoxikus, nagyobb koncentrációkban), mint fungisztatikus (kisebb koncentrációkban) *C. albicans* sejteken tesztelve. A torma illóolaj néhány óra elteltével elpusztította a gomba sejteket. A kísérleteink során 1-2 esetben néhány sejt túlélte még a 25 μ l torma illóolaj-YPD/ml tápközeges kezelést is, de ezeket a sejteket csak az idősebb tenyészetekben tudtuk kimutatni. Tehát mindössze néhány sejt maradt életben az illóolajos kezelés hatására, majd a torma illóolaj tenyészetekből való elpárolgását követően a túlélő sejtek újra elkezdtek növekedni, így az idős tenyészetekben a sejtsűrűség elérte újra a kimutatási határt.

A torma illóolaj *in vitro* interakcióját vizsgáltuk redukált (GSH) és oxidált (GSSG) glutationnal és glutation reduktázzal, mely során a torma illóolaj (1 μ l/ml) 0,5 órás inkubálási periódust követően 84 ± 5 %-kal csökkentette az 50mM kiindulási koncentrációjú minták GSH tartalmát, valamint 42 ± 7 %-al a kiindulási 35 U/ml GR (*S. cerevisiae*-ből) aktivitását. GSSG esetében (50 mM kiindulási koncentráció) nem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést.

A torma illóolaj oxidatív stresszt indukált, melyet kezelt kultúrák megemelkedett szuperoxid szintje, és az indukált specifikus glutation-reduktáz, glutation-peroxidáz, kataláz és szuperoxid diszmutáz aktivitás mutatott. A GSH és GSSG tartalom viszont meglepő módon nem változott, a kultúrák növekedése mégis csökkent. Magasabb koncentrációban (2,5 μ l torma illóolaj-YPD/ml tápközeg), 3 órás expozíció viszont kiürítette a GSH-poolt, miközben a szuperoxid szint erősen megnövekedett és azonnal megölte a sejteket (20. ábra), még az antioxidáns enzimek indukálódása előtt.

A torma illóolaj antifungális hatása antagonizmust mutatott MSB-el és diamiddal, valamint szinergizmust CDNB-lal. Az antagonizmus magyarázata lehet az antioxidáns enzimek és/vagy GSH termelése. A szinergizmus valószínűleg a CDNB GSH-pool kiürítő hatásának a következménye.

KÖVETKEZTETÉSEK, TÉZISEK

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a HRC-k GLS mintázata eltér a natív gyökér mintázatától. Az aromás GLN dominál az alifás SIN helyett. A HRC-kben szintén domináns indol-GLS-ok az agrobakteriális géntranszformáció termékei is lehetnek.

Megállapítottuk, hogy a torma hairy root kultúrák enzim és metabolit mintázatában meghatározó szerepe van az inokulált növényi szervnek (levélnyél vs levéllemez).

Vizsgálataink alapján feltételezzük, hogy a biológiailag aktív komponensek mintázata a MYR izoenzim mintázattól függ.

Kimutattuk, hogy a torma illóolaj antifungális hatással bír fonalas és sarjadzó, valamint humán patogén és apatogén gombákra, illékony és folyadék fázisban egyaránt.

Kísérleteink alapján a torma illóolaj (természetes ITC-ok keveréke) erősebb antifungális hatással bír, mint főkomponensei (AITC, PEITC) önmagukban.

Megfigyeltük a torma illóolaj koncentráció függő fungicid (nagyobb koncentrációk), ill. fungisztatikus (kisebb koncentrációk) hatását.

Megerősítettük a hipotézis, mi szerint a torma illóolaj oxidatív stressz úton hat. Megállapítottuk, hogy ettől a hatástól a védi a GSH a *C. albicans* sejteket. Amíg van elegendő GSH, a gombasejt túlél.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés alapját képező saját közlemények

Bertóti R, Böszörményi A, Alberti Á, Béni S, Szőke É, Vasas G, Gonda S. (2019) Variability of Bioactive Glucosinolates, Isothiocyanates and Enzyme Patterns in Horseradish Hairy Root Cultures Initiated from Different Organs. *Molecules*, 24(15): 2828.

Bertóti R, Vasas G, Gonda S, Nguyen N. M, Szőke É, Jakab Á, Pócsi I, Emri, T. (2016) Glutathione protects *Candida albicans* against horseradish volatile oil. *J basic microbiol*, 56(10): 1071-1079.

A disszertációtól független közlemény

Szűcs Z, Plaszkó T, Cziáky Z, Kiss-Szikszai A, Emri T, Bertóti R, Sinka L.T, Vasas G, Gonda S. (2018) Endophytic fungi from the roots of horseradish (*Armoracia rusticana*) and their interactions with the defensive metabolites of the glükosinolate-myrosinase-isothiocyanate system. *BMC Plant Biol*. 18: 85.