

„XXXII. OTDK Biológia Szekció”

A linalool prooxidáns és antioxidáns hatásainak vizsgálata *Candida albicans* modellszervezeten

Készítette: KOVÁCS DOMINIKA

Biológus MSc hallgató

I. évfolyam

Témavezetők:

MÁTÉ GÁBOR

Dr. GAZDAG ZOLTÁN

Prof. PESTI MIKLÓS

Pécsi Tudományegyetem

Pécs, 2015.

Tartalomjegyzék

I. Rövidítések jegyzéke.....	3
II. Bevezetés	4
III. Irodalmi áttekintés	5
III.1. A <i>Candida albicans</i> általános jellemzése	5
III.2. Az esszenciális olajok általános jellemzése	6
III.2.1. Terpének	7
III.3. Linalool	7
III.3.1. Fizikai és kémiai tulajdonságok.....	8
III.3.2. Magasabb rendű szervezetekre gyakorolt hatások.....	8
III.3.3. Sejtszintű hatások	10
III.3.3.1. Plazmamembránra gyakorolt hatások	10
III.3.3.2. Mitokondriumra gyakorolt hatások	11
III.3.3.3. Sejtciklusra gyakorolt hatások	11
III.3.3.4. Oxidatív stresszt indukáló hatások	11
III.3.3.5. Mutagén, karcinogén hatások	12
III.3.3.6. Antioxidáns, antimutagén hatások	12
III.4. Az oxidatív stressz	13
III.4.1. Szuperoxid gyök	14
III.4.2. Hidrogén-peroxid.....	14
III.4.3. Hidroxilgyök.....	14
III.5. Az antioxidáns védelmi rendszer	15
III.5.1. Nem enzimátikus védelmi rendszer	15
III.5.2. Enzimátikus védelmi rendszer	15
III.5.3. Antioxidáns anyagok által indukált oxidatív stressz	16
IV. Célkitűzés.....	17
V. Anyag és módszer	18
V.1. Mikroorganizmus	18
V.2. Törzsfenntartás, rázatott tenyészet készítése, kezelés.....	18
V.3. Táptalajok, tápoldatok, pufferek	18
V.4. Módszerek.....	20

V.4.1. Linalool szubinhibítori koncentrációjának meghatározása.....	20
V.4.2. Intracelluláris reaktív oxigén származékok mérése	20
V.4.3. Szuperoxid gyök koncentráció mérés	21
V.4.4. Peroxid koncentráció mérés	21
V.4.5. Linalool indukálta lipidperoxidáció vizsgálata	21
V.4.6. Az adaptáció vizsgálata.....	22
V.4.7. Minták előkészítése enzimaktivitás méréshez	22
V.4.8. Fehérjetartalom mérése	22
V.4.9. Glutation-reduktáz mérése	23
V.4.10. Glutation-S-transzferáz mérése.....	23
V.4.11. Kataláz mérése	24
V.4.12. Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz mérése	24
V.4.13. Glutation-peroxidáz mérése	24
V.4.14. Szuperoxid-dizmutáz mérése	25
V.4.15. Redukált glutation és oxidált glutation koncentráció mérése	25
V.4.16. Teljes antioxidáns kapacitás mérés ABTS ^{•+} gyökkel	26
V.4.17. Szuperoxid gyök és linalool közti <i>in vitro</i> interakció vizsgálata	27
VI. Eredmények és értékelésük	28
VI.3. A linalool szubinhibítori koncentrációjának megállapítása.....	28
VI.4. Teljes intracelluláris reaktív oxigén származékok mennyiségi meghatározása	28
VI.3. Linalool indukálta lipidperoxidáció vizsgálata.....	29
VI.4. Adaptáció vizsgálata.....	29
VI.5. Antioxidáns rendszer változásainak vizsgálata	30
VI.6. A linalool teljes antioxidáns kapacitásának meghatározása	31
VI.7. Szuperoxid gyök és linalool közti <i>in vitro</i> interakció vizsgálata.....	32
VII. Diszkusszió	34

I. Rövidítések jegyzéke

•OH	hidroxilgyök
ABTS	2,2'-azino-bisz (3-etilbenzotiazolin-6-szulfoninsav)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CAT	kataláz
DCF	2',7' –diklorofluorescein
DCFDA	2',7' –diklorofluorescein diacetát
DHE	dihydroethidium
DHR123	dihydrorhodamine 123
G6PD	glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
GPx	glutation-peroxidáz
GR	glutation-reduktáz
GSH	glutation
GSSG	oxidált glutation, glutation diszulfid
GST	glutation-S-transzferáz
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NBT	nitro blue tetrazolium chloride
O ₂ • ⁻	szuperoxid anion gyök
ROS	reaktív oxigén származékok
SOD	szuperoxid-dizmutáz

II. Bevezetés

Egy ókori római közmondás szerint -„Cur moriatur homo cui Salvia crescit in horto”- miért kellene egy embernek meghalni, ha zsálya nő a kertjében (Kamatau és mtsai., 2008), azonban ez csak egy példa a sok közül, amikor a népi gyógyászat felhasznált, felhasznál valamilyen növényi kivonatot. Antibakteriális és antifungális hatásukat kihasználva alkalmasnak bizonyultak a járványok elleni védekezésben, használták őket a láz, a fejfájás és a köhögés csillapítására, illetve az élelmiszerek tartósítására egyaránt, sőt a vallási életben is fontos szerepet töltöttek be. A középkor idején felfedezték, hogy lepárlással aromás kivonatok állíthatóak elő, ami miatt az illóolajokat illatszerként és testápolás céljából is elkezdték használni. Mára a nagyüzemi termelés lehetővé teszi az illóolajok mesterséges előállítását, ezek azonban egyedül a kozmetikai ipar számára alkalmasak, terápiás célból csakis természetes növényi esszenciális olajok alkalmazhatóak (Frank és Kürti, 2003).

Napjainkban a szintetikus tartósítószerekkel szemben folyamatosan nő az igény a természetes antimikrobiális hatóanyagok iránt, egyre többen fordulnak az intézményes orvosi kezelés mellett alternatív gyógymódokhoz, például az aromaterápiához, ami újra a figyelem középpontjába állította az illóolajokat. A növényi esszenciális olajok széles spektrumú antibakteriális, antifungális hatásának hátterében egyfelől oxidatív stressz indukáló hatásuk állhat, másfelől pedig a plazmamembránra kifejtett erős fluidizáló hatásuk. A prooxidáns hatás mellett az illóolajok bizonyítottan rendelkeznek antioxidáns tulajdonságokkal is.

Mindezekből kifolyólag az illóolajok valóban hatásos és biztonságos felhasználásához nélkülözhetetlen az egyes komponensek élő sejtre, szervezetre gyakorolt hatásának megismerése. Munkánk során egy széles körben alkalmazott összetevő, a linalool hatásmechanizmusát vizsgáltuk élő sejteken, mely kísérletekhez a számos kórképet okozó humánpatogén *Candida albicans* alkalmas modellszervezetnek bizonyult.

III. Irodalmi áttekintés

III.1. A *Candida albicans* általános jellemzése

A *Candida* nemzetség 200 faja közül az egyik legjelentősebb opportunista humán patogén gomba a *Candida albicans* (*C. albicans*). A *C. albicans* normál körülmények között jelen van a gazdaszervezetben, a bél baktériumflórájának szabályozása alatt áll, más baktériumokkal együtt az egyes szervek (bélrendszer, szájüreg, hüvely) normál flóráját alkotja, amely elengedhetetlen azok megfelelő működéséhez. Az 1800-as évektől kezdődően bizonyított tény, hogy a *C. albicans* áll számos, patológiás jelenség hátterében. Az 1970-es évek óta körülbelül 15-80-szorosára emelkedett a kandidóziok száma, melyekért 70-80%-ban ez a humánpatogén gomba a felelős.

A diploid *C. albicans* kromoszóma száma 6-8, erős heterozigótáság jellemzi, valamint a *Fungi Imperfecti* csoportba sorolható, mivel sem a szexuális, sem a paraszexuális sejtciklusa nem ismert (Gazdag, 2008). Rendszertanilag az *Ascomycota* tömlősgombák törzsébe, a *Hemiascomycetes* osztályban, a *Saccharomycetaceae* rendbe, ezen belül pedig a *Candida* nemzetségbe tartozik.

A *C. albicans* fertőzőképességéhez elengedhetetlenek a különböző virulencia faktorok, mint a gazdaszervezettel, szövetekkel való adhézíós képesség, a morfológiai változás (hifaképzés), a proteáz szekréció, a gazdaszervezet immunrendszere elleni védekezés, valamint az oxidatív stressz elleni védelem a szuperoxid dizmutáz enzim segítségével (Cheol és mtsai., 2002). A *Candida* fajok által okozott megbetegedéseknél megkülönböztetünk szuperficiális (felszínen lévő sejteket érintő), kután (bőrfelszíni), szubkután (bőr alatti) és invazív (szisztémás) kandidózist (Kocsubé, 2012). Az invazív kandidózison belül elkülönítünk lokalizált, azaz egyetlen szervet érintő, valamint disszeminált formát, amely esetében a vér- és nyirokrendszer révén több szervre is kiterjedhet a betegség (Jakucs és Vajna, 2003). Leggyakrabban a legyengült immunrendszerűek, a lisztérzékenyek vagy az antibiotikumot szedők vannak kitéve ezen fertőzésnek, de kockázati tényező még a stressz, a fogamzásgátlók és szteroidok szedése, valamint a szénhidrátdús táplálkozás is. Gyakori jelenség a kandidózis újszülötteknél, koraszülötteknél, különböző kórházi osztályokon kezelt személyeknél, valamint AIDS-betegeknél (Kocsubé, 2012). Napjainkban, a szisztémás kandidózis hátterében nagyobb részt az egyes izolátumok gyógyszerekkel szembeni fokozott rezisztenciája áll, ami felveti az új, lehetséges terápiás eljárások kifejlesztését. Ebből kifolyólag mára egyre nagyobb figyelem terelődik a természetes növényi illóolajok vizsgálatára.

III.2. Az esszenciális olajok általános jellemzése

Az esszenciális olajok alapvető közös tulajdonsága, hogy erős szagú, természetes, komplex másodlagos növényi anyagcseretermékek, folyékonyak, rendkívül illékonyak, zsírban és szerves oldószerben oldódnak, áttetszőek, ritkán színesek, valamint a sűrűségük alacsonyabb, mint a vízé. Kinyerésük többféle módon történhet: préseléssel, desztillációval vagy oldószeres extrakcióval, majd gázkromatográfiás illetve tömeg spektrofotometriás méréssel analizálhatóak az egyes komponensek. Egyes olajok akár 20-60 komponenst is tartalmazhatnak különböző koncentrációban, amely lényegében az olaj biológiai hatását határozza meg. Komplex összetételű „rendszerrel” lévén szó, az egyes komponensek egymásra gyakorolt hatása egyelőre ismeretlen, de egymás hatását antagonista módon gátolhatják, illetve szinergista vagy additív módon erősíthetik. A növényi esszenciális olajok fő összetevői az izoprénvázas, strukturálisan és funkcionálisan is eltérő terpének, az oxigéntartalmú terpének (terpenoidok), valamint kisebb mennyiségben tartalmaznak alifás és aromás komponenseket, pl. alkoholokat, aldehideket, kén- és nitrogéntartalmú vegyületeket, észtereket (Bakkali és mtsai., 2008). Jellemzően a mediterrán és a trópusi növények tartalmaznak nagyobb mennyiségben illóolajokat, melyek fellelhetőek a virágokban, a szárban, a gyökérben, a magokban, a levelekben, a gallyakban, a szekréciós sejtekben, az üregekben, a hámsejtekben és a mirigyszőrökben egyaránt. Fontos szerepet töltenek be a növények védelmében, például a *Cinnamomum camphora* által termelt illóolaj taszító (repellens) hatást fejt ki a maláriaszúnyogra (*Aedes aegypti*); másrészt attraktáns hatásuknak köszönhetően vonzzák a rovarokat, ezzel segítve a beporzást, a megtermékenyítést (Opdyke, 1975; Bakkali és mtsai., 2008).

A növényi esszenciális olajokat már az ókor óta széles körben használják baktérium-, gomba-, parazita- és vírusölő, valamint fájdalomcsillapító és görcsoldó hatásuk miatt. A jelenleg ismert 3000 illóolaj közül kb. 300-at használnak fel kereskedelmi célokra. Az élelmiszeripar tartósítószerként és ízfokozóként, míg a kozmetikai ipar parfümökhöz, sminktermékekhez, krémekhez, masszázsolajokhoz, aromaterápiás készítményekben alkalmazza (Bakkali és mtsai., 2008).

Abból adódóan, hogy az illóolajok számos komponenst tartalmaznak, úgy tűnhet nincs specifikus célpontjuk a sejten. Lipofil természetüknek köszönhetően könnyen áthatolnak a sejtfalon, sejtmembránon, hatásukat kifejtik a foszfolipidekre, poliszacharidokra, zsírsavakra, melynek következtében szerkezetváltozás, permeabilitás fokozódás jön létre. A sejtmembrán károsításán keresztül a baktériumok ionokat vesztenek, ami membránpotenciál csökkenéshez

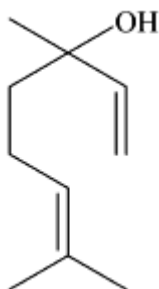
vezet, valamint a proton pumpák károsodása végett az ATP raktárak is kiürülhetnek. Az illóolajok képesek koagulálni a citoplazmát, ezzel a lipideket és fehérjéket roncsolni (Bakkali és mtsai., 2008). Az eukarióta sejtek mitokondriális membránjában depolarizációt válthatnak ki, ami megfigyelhető a membránpotenciál csökkenésében és a Ca^{2+} beáramlás megváltozásában. Ezek a változások fokozzák a membránon keresztüli szivárgást (szabadgyökök, citokró-m-c, fehérjék, Ca^{2+}), melynek következtében oxidatív stresszfolyamatok indukálódnak, amit ha a sejt nem képes szabályozni, tolerálni bekövetkezik az apoptózis vagy nekrozis (Bakkali és mtsai., 2008). Az illóolajok prooxidáns hatásán túl beszélhetünk antioxidáns, szabadgyök befogó hatásokról is, amit nagyban befolyásol a terpenoid és fenolos komponensek mennyisége. (Bakkali és mtsai., 2008).

III.2.1. Terpének

A terpének az izoprének egyik nagy csoportját alkotó vegyületek, melyek csoportosítása az izoprén alegységek száma alapján történik. Az illóolajok 90%-ban monoterpénket (C_{10}) tartalmaznak, melyek két izoprén alegység kondenzációjával jönnek létre. Ide sorolható például a linalool, a mircén, az eukaliptol, a geraniol, a mentol, az ocimén és a carvon. Ezeket nagy mennyiségben tartalmazza pl. a zsálya, a babérfa, a citrom, a borsmenta valamint a kömény. Az összetételt, ezáltal az olaj hatását erőteljesen befolyásolja a termőtáj, a csapadék mennyisége, a napfény, valamint a földrajzi elhelyezkedés is.

III.3. Linalool

A linalool az egyik legfőbb monoterpén, melyet világszerte felhasználnak parfümök, illatosítók, samponok, tisztítószerke előállításához. Más hivatalos megnevezései a koriandrol, 3,7-dimetil-1,6-oktadién-3-ol; 2,6-dimetil-2,7-oktadién-6-ol; licareol; 1,6-oktadién-3-ol (Letizia és mtsai., 2003).



1.ábra. A linalool szerkezeti képlete (Letizia és mtsai., 2003).

III.3.1. Fizikai és kémiai tulajdonságok

A linalool folyékony halmazállapotú, színe a színtelentől egészen halvány sárgáig terjedhet, gőznyomása 0,05 Hgmm (20 °C), forráspontja 198 °C, refraktív indexe 1.460–1.463 (20 °C), fajsúlya 0.860–0.864 (Letizia és mtsai., 2003). A linalool optikailag aktív (*d*- és *l*-), valamint optikailag inaktív formában több mint 200 növényi olajban fordul elő. *L*-linaloolt legnagyobb mennyiségben a kámforfa, az ilang-ilang, a levendula és a bergamot tartalmaz. A *d*-forma leggyakrabban a korianderben és a majorannában, az inaktív forma pedig a muskotályzsályában és a jázminban található meg (Opdyke, 1975).

III.3.2. Magasabb rendű szervezetekre gyakorolt hatások

A linalool hatásmechanizmusának tárgyalása során szükséges az akut és krónikus hatások elkülönítése és az adott „rendszer” életképességének (élő sejtszámának) a megállapítása. Akut kezelés során rendszerint csak egyszeri kezeléstről és egy gyors „lefolyású” tünetegyüttesről beszélhetünk, míg a krónikus kezelések esetén többszöri, elnyúló expozícióról és egy hosszú távú „lappangó” folyamatról (Omar, 2013). Ennek következtében a krónikus kezelések után egy komplex regulációs rendszer végeredményét látjuk, míg az akut kezelések során a direkt hatást.

Patkányokat vizsgálva orális expozíció esetében a linalool akut LD₅₀ értéke (a hatóanyag azon mennyisége, amely 24 órán belül a kísérleti állatok 50%-nak a pusztulását okozza) 2790 mg/kg volt. A pusztuláson kívül a legfőbb szisztémás tünet az ataxia, depresszió, illetve nehézlégzés volt. Három, 1500-2300 gramm tömegű nyúlnál dermális expozíció után 2,5 g/kg linaloolnál még nem volt megfigyelhető a kísérleti állatok pusztulása, 5,0 g/kg-nál már a 3-ból 1, 10 g/kg-nál pedig mindhárom egyed elpusztult. Ebből adódóan az LD₅₀ értékét 5,61 g/kg-ra becsülték. Szubkután expozíciót alkalmazva egereknél (10-15 g) az LD₅₀ érték 1,47±0,14 g/kg, emellett 48 órán belül a lábak bénulása volt megfigyelhető. Intraperitoneális 50, 160, 500, 1600 vagy 5000 mg/kg linaloolt kapott minden kísérleti patkány. A két legmagasabb koncentrációt alkalmazva az összes egyed elpusztult. Intramuszkuláris adagolásnál egerek esetében az LD₅₀ érték 8,6 g/kg, míg inhalációs expozíció során szintén egereknél 350 µg/l (Letizia és mtsai., 2003).

450 gramm testtömegű tengerimalacokat intradermális injektálással, illetve a megtisztított bőrfelületen keresztül kezeltek linaloolal. Intradermális expozíció esetén már a 0,05%-os koncentráció enyhe bőrirritációt váltott ki, míg dermális expozíció során a 10%-os koncentráció semmilyen tünetet nem okozott. 48 órás patch-teszt segítségével sertéseken

kísérletezve, 50 mg hígítatlan linalool nem okozott semmiféle irritációt, míg angóra nyulakon 0,1 ml hígítatlan linalool súlyos irritációhoz vezetett (Letizia és mtsai., 2003).

A szem irritációjának vizsgálatokor a kísérleti nyulak egyik szemébe 0,1 ml hígítatlan linalool került, a másik szem kontrollként szolgált, majd fluoreszcein befecskendezésével nyomon követték a szaruhártya változását. A teszt során enyhe kötőhártya irritáció lépett fel.

Egy másik kísérleti rendszerben a linalool különböző koncentrációival kezelték, szintén a nyulak egyik szemét. A 3%-os linalool még nem okozott irritációt, a 10%-os már mind a hat egyednél nagyon enyhe kötőhártya irritációt váltott ki, a 30%-os linalool a 4. napon öt egyednél eredményezett kötőhártya irritációt, a 100%-os pedig már a szaruhártyában is okozott elváltozásokat az összes egyed esetében (Letizia és mtsai., 2003).

A linalool emberi szervezetre gyakorolt akut élettani hatását is a patch-teszt segítségével határozzák meg. 48 órás háton történő expozíció után a 32%-os linalool enyhe, míg a 20%-os linalool nem váltott ki bőrirritációt. A 2%-os, illetve 0,4%-os koncentrációt tartalmazó tapasz a belső karra helyezve szintén nem okozott irritációt (Letizia és mtsai., 2003). Bickers és munkatársai (2003) 90 percen keresztül mérték a vér linalool koncentrációját, miután egy adott bőrterület levendula- és mogyoróolaj keverékéből álló masszázsolajjal dörzsöltek be. A levendulaolaj 25% linaloolt tartalmazott, amely már 5 perc után észlelhető volt a vérben. A 19. percben a vérplazma linalool koncentrációja 100 ng/ml volt, a 90. percre a vizsgált anyag eltűnt a vérből, a felezési ideje így körülbelül 14 perc (Bickers és mtsai., 2003). A linalool krónikus hatásait 140-157 grammos hím és 136-142 grammos nőstény patkányokon vizsgálták 13 héten keresztül. Dermális expozíció útján az egyes csoportba tartozó egyedek naponta 0,25; 1,0; 4,0 g/kg linaloolt kaptak. A legmagasabb kezelési koncentráció hatására 9 nőstény és 2 hím pusztult el. Az egyedek aktivitásának csökkenése mindegyik csoportban megfigyelhető volt, valamint a legmagasabb koncentrációval kezelt nőstényeknél letargia jelentkezett. A bőrpír, mint krónikus tünet mindegyik csoportra jellemző volt, emellett étvágytalanság, súlycsökkenés lépett fel. Megnövekedett a máj, illetve a vesék tömege a 4,0 g/kg dózissal kezelték körében. A hematológiai és urológiai vizsgálatok eredményei nem mutattak változást, valamint nem alakult ki szövettani elváltozás egyetlen szervben sem (Letizia és mtsai., 2003).

A linalool reprodukcióra illetve fejlődésre kifejtett hatását 72,9% linaloolt tartalmazó korianderolajjal végezték nőstény patkányokon. 250, 500, illetve 1000 mg/kg hatóanyagot kaptak naponta az egyes kísérleti egyedek a hímekkel való párzás, vemhesség valamint a szoptatási időszak alatt. A kísérlet során nem történt haláleset, de beszámoltak felesleges nyáladzásról, motoros funkciók csökkenéséről, ataxiáról, testsúlygyarapodásról, mindezen

felül az olaj egyes esetekben méhen belüli vagy postnatális halálhoz vezetett (Letizia és mtsai., 2003).

III.3.3. Sejtszintű hatások

III.3.3.1. Plazmamembránra gyakorolt hatások

Azonos testtömegű hím egerek krónikus kezelésben, hat héten keresztül szájon át kaptak napi 0,57 mg illetve 12 mg linaloolt, majd a májsejtek lipidtartalmát vizsgálták. A hatodik hét elteltével mindkét dózis esetében a totál koleszterin szint 14%-kal, a triglicerid szint 31%-kal, az LDL (alacsony sűrűségű lipoprotein) szint pedig 42%-kal csökkent, míg a HDL (magas sűrűségű lipoprotein) 26%-kal emelkedett. HepG2 (hepatocelluláris karcinóma) sejtek esetében 1 mM linalool a koleszterol, illetve triglicerid szintet 34-37%-kal csökkentette. 0,5 mM linalool a HepG2 sejtekben 66%-kal, egér májsejtben 60%-kal csökkentette a szterinek szintéziséért felelős SREBP-2 transzkripciós faktor expresszióját (Cho és mtsai., 2011).

Tengerimalacok 4 héten keresztül napi egyszer intraperitoneálisan kaptak linaloolt, H₂O₂-ot, vagy linaloolt és H₂O₂-ot együttesen. A későbbiekben az agy lipid összetételében bekövetkezett változásokat vizsgálták. 120 mg/kg linalool hatására nőtt a totál lipid, a többszörösen telítetlen- (PUFA), és telítetlen zsírsav (USFA) szint, valamint csökkent a telített zsírsav (SFA) szint. Az oxidatív stressz generáló H₂O₂ hatására a totál lipid tartalom, az USFA, és a PUFA is csökkent, míg az SFA szint nőtt. A két vizsgált anyagot együttesen alkalmazva kismértékű változás következett be, ami arra enged következtetni, hogy a linalool kompenzálta a H₂O₂ által indukált változásokat, tehát antioxidáns tulajdonsággal is rendelkezik (Celik és Özkaya, 2002).

Linalool kezelt H1299 sejtvonalból származó szülői és epirubicin rezisztens sejtek malondialdehid (lipidperoxidáció markere) és a 8-OHdG (DNS károsodás markere) szintje koncentrációfüggő módon emelkedett, melybizonyítja a linalool membrán és DNS károsító hatását (Erdogan és mtsai., 2013). HepG2 és humán alveoláris adenokarcinóma sejtek 48 órás akut kezelése során a linalool szubinhibítori koncentrációjának hatására bekövetkezett a koleszterin bioszintézis gátlása, csökkent a radioaktívan jelölt acetát beépülése mind a koleszterinbe, mind a szintézis útvonal prekursorába, a szkvalénbe. Továbbá csökkent a 3-hidroxy-3-methylglutaryl-CoA termeléséért felelős gén expressziója, ezzel gátolva a koleszterin bioszintézist (Kladniew és mtsai., 2014)

A gombák sejtmembránja szinte teljesen megegyezik az általános eukarióta membránnal, annyi kivétellel, hogy a plazmamembrán fluiditásának szabályozásáért felelős koleszterin helyett ergoszterint tartalmaz. A linalool szubinhibítori, valamint inhibítori koncentrációját alkalmazva 16 órán keresztül, a kezelt *C. albicans* sejtek plazmamembránjának ergoszterin szintje jelentősen csökkent. Konfokális mikroszkóppal megfigyelve a 4-szeres minimális gátló koncentrációval kezelt sejteken a propídium jodid (PI) fluoreszcens festék beáramlása megnövekedett, ami bizonyította a plazmamembrán dezorganizációját (Khan és mtsai., 2010). Kimutatták, hogy a linalool képes a plazmamembrán permeabilitásának megváltoztatásán keresztül fokozni a különböző antibiotikumok hatását. *C. albicans* sejteket vizsgálva a linalool LD₅₀-es koncentrációja a flukonazol minimális gátló koncentrációját 64 µg/ml-ről 1 µg/ml-re csökkentette, azaz a két hatóanyag között erőteljes szinergista hatás figyelhető meg (Zore és mtsai., 2011).

III.3.3.2. Mitokondriumra gyakorolt hatások

Patkány HepG2 sejtekből izolált mitokondriális komplexek aktivitását mérték *in vitro*, továbbá figyelemmel követték az ATP, ROS illetve glutation (GSH) koncentrációváltozást is. A linalool LD₅₀-es koncentrációja (0,4 µM) gátló hatással volt az I. és II. mitokondriális komplexre, aminek következtében mérséklődött az elektronáramlás az elektrontranszport rendszeren keresztül. Ez egy közel 40%-os ATP csökkenéshez vezetett, a kialakult energiahányos állapot pedig apoptózishoz vezet (Usta és mtsai., 2009).

III.3.3.3. Sejtciklusra gyakorolt hatások

C. albicans sejteket kezeltek a linalool minimális gátló koncentrációjával, majd áramlási citométer segítségével megállapították, hogy a kontroll tenyészetéhez viszonyítva a linalool kezelés szignifikáns emelkedést mutatott a G1 sejtek számában, ami a G1/S fázisblokk eredménye (Zore és mtsai., 2011).

Leukémia sejteket 48 órán keresztül 130 µM linaloollal kezeltek, aminek az eredményeként a G₀/G₁, S, G₂/M sejtfázisban lévő sejtek száma lecsökkent, míg a sub-G₁ fázisban lévők megemelkedett (Gu és mtsai., 2009).

III.3.3.4. Oxidatív stresszt indukáló hatások

A mitokondriális légzési lánc gátlásának következtében az oxigénnek csak egy elektronos redukciója történik meg, ami szuperoxid gyök keletkezéséhez vezet. (Pelicano és mtsai., 2003). 24 órás kezelésben a linalool LD₅₀-es koncentrációja (0,4 µM) 50%-kal, míg a

100%-os (2 μ M) pusztítást okozó koncentráció 80%-kal növelte a sejtek intracelluláris ROS tartalmát. Párhuzamos méréseket folytatva, ugyanezen két koncentráció a GSH szintet 50, illetve 80%-kal csökkentette. Ha a sejteket előkezelték anitoxidáns molekulákkal (N-acetil cisztein, Trolox, flavonoidok), a sejtek életképességét illetően növekedés volt megfigyelhető, ami szintén alátámasztja a linalool oxidatív stressz indukáló hatását (Usta és mtsai., 2009).

Ha a sejtek nem képesek regulálni az intracelluláris gyökök magas koncentrációját és az ennek következményeként kialakuló oxidatív károsodásokat, akkor bekövetkezik a sejtek szabályozott halála, az apoptózis (Bakkali és mtsai., 2008; Perrone és mtsai., 2008). Gu és mtsai. (2009) leukémia sejteket kezelve 12 órán keresztül linaloolal megfigyelték az apoptózis markereinek számító p56, CDKIs, p21^{waf1}, p21^{Kip1}, p21^{Kip2}, GADD45 α és c-Jun fokozott aktivitását. Zore és mtsai. (2011) is szignifikáns emelkedést figyelt meg az apoptotikus sejtek számában a *C. albicans* élesztőgombát vizsgálva.

III.3.3.5. Mutagén, karcinogén hatások

Salmonella typhimurium-on végzett Ames teszt során a linalool 0,05-100 μ l dózisban nem bizonyult mutagénnek, ahogy számos más mikroorganizmuson sem. Mikronukleusz teszt segítségével egereken is vizsgálták a hatóanyagot. 500, 1000 illetve 1500 mg/kg linalool adagolása után a csontvelő vizsgálata következett. Alapesetben a polikromáziás eritrocitákban megjelent mikronukleuszok jelzik a mutagén hatást. A magasabb dózisú csoportban letargia, illetve ataxia jelentkezett, azonban a tünetek két nap után mérséklődtek. Egyik kezelés hatására sem történt növekedés a mikronukleált polikromáziás eritrociták mennyiségében, ami szintén alátámasztja azt a tényt, miszerint a linalool nem mutagén hatású.

A linalool tumorképző, karcinogén hatását egereken 33 héten keresztül vizsgálták, heti egyszeri 20%-os linalool dermális adagolásával, 7,12-dimetilbenzantarcén előkezelés után. A kísérlet végeztével egy gyenge tumor indukáló hatásról számoltak be (Letizia és mtsai., 2003).

III.3.3.6. Antioxidáns, antimutagén hatások

ESR spektroszkópiai mérések során bizonyították, hogy a linalool 0,4 mM-os és annál nagyobb koncentrációban hatékonyan képes megkötni a szinglet oxigént (Ao és mtsai., 2008). Makrofág sejtekben lipopoliszacharid (LPS) segítségével nitrozatív stresszt indukáltak, amelyre a nitrit felhalmozódásából következtek. 1; 0,1; 0,0001 mM linalool hatására koncentráció-függő módon csökkent a sejtek nitrit szintje (Peana és mtsai., 2005).

A linalool 0,5 μ M-os koncentrációja *S. cerevisiae* sejtekben felére csökkentette a H₂O₂ által okozott DNS törések mennyiségét az együtt kezelés során (Stanojevic és mtsai., 2004).

Mutáns *E. coli* törzsekben *tert*-butil hidroperoxid segítségével (25 µg/lemez) mutagenézist indukáltak, majd vizsgálták a revertáns telepek számát. A linalool egyre növekvő koncentrációjának hatására csökkent a revertáns telepek száma (Mitic-Culafic és mtsai., 2009).

III.4. Az oxidatív stressz

Minden élő sejt és szervezet ki van téve egyfajta stressznek, amely a különböző kémiai illetve fizikai tényezők megváltozásából ered (hőmérséklet, nyomás, ozmotikus viszonyok, redox potenciál, tápanyag ellátottság). Normál körülmények között a sejten belül a prooxidánsok egyensúlyban állnak az enzimatis és nem enzimatis antioxidánsokkal, ami a sejt védetségét eredményezi. Ha a homeosztázis felborul, azaz a szabadgyökök keletkezése kontrollálatlanná válik, vagy az antioxidáns védelmi rendszer nem működik megfelelően, akkor oxidatív stressz alakul ki (Halliwell és Gutteridge, 1999).

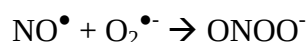
A szabadgyökök olyan rövid élettartamú, párosítatlan elektronnal rendelkező atomok vagy molekulák, melyek rendkívül instabilak, reakcióképesek (Carocho és mtsai., 2013). Keletkezésük láncreakciószerű, amely abban az esetben fejeződik be, ha a szabad gyök egy másik molekulával nem reaktív biomolekulát hoz létre. Megkülönböztetünk egymástól reaktív oxigén (ROS), reaktív nitrogén (RNS), illetve reaktív kén származékokat (RSS). A gyökös természetű ROS-okhoz tartozik a szuperoxid anion gyök ($O_2^{\bullet-}$), a hidroperoxil gyök ($HO_2^{\bullet-}$), a hidroxilgyök ($\bullet OH$), nem szabad gyök természetű pedig a szinglett oxigén (1O_2) és a hidrogén-peroxid (H_2O_2). Ezen molekulák jelenléte a sejtekben teljesen természetes, az anyagcsere folyamatok során keletkezhetnek a mitokondriumban, peroxisómában, fagocitóziskor, de számos külső tényező is növeli a kialakulásuk esélyét, mint a dohányzás, az UV sugárzás, a peszticidek vagy gyógyszerek (Carocho és mtsai., 2013).

A ROS-ok elsődleges célpontjainak tekinthetők a nukleinsavak, a lipidek, a fehérjék, illetve a szénhidrátok (Carocho és mtsai., 2013). A DNS és RNS károsítása a purin és pirimidin bázisokon, illetve a dezoxiribózokon vagy ribózokon keresztül történik. A $O_2^{\bullet-}$ és H_2O_2 jóval kevésbé reaktív, szinte egyáltalán nem lép reakcióba a fent említett molekulákkal, ezzel ellentétben a $\bullet OH$ deléció, frameshift mutációt, bázismódosításokat okoz, ami leggyakrabban 8-OH-guanozin képződéséhez vezet (Qiang és mtsai., 2009). A sejtmembránban lokalizálódó foszfolipidek rendkívül érzékenyek a ROS-okra. A lipidperoxidáció során a szabad gyök a telítetlen zsírsavlánchról H elvonásával karbon szabadgyököt generál, mely tovább alakulhat peroxil, illetve alkoxil gyökké. Ezek egy láncreakciót elindítva toxikus aldehideket (malondialdehyd) hoznak létre, ezzel további

sejtalkotókat károsítva. A szabad gyökök képesek a peptidláncok fragmentációjára, valamint fehérje-fehérje keresztkötések kialakítására, ami a fehérjék aggregációjához vezet (Halliwell és Gutteridge, 1999).

III.4.1. Szuperoxid gyök

Az alapállapotú molekuláris oxigén redukciójával kapjuk a $O_2^{\bullet-}$, amely keletkezhet nem enzimatikusan például a mitokondriális légzési lánc működése során, a kloroplasztiszban, vagy enzimatikusan a NADH/NADPH-oxidáz, xantin-oxidáz, lipoxigenáz, ciklooxigennáz, P-450 monooxigenáz működése során az endoplazmás retikulumban. A $\bullet OH$ -kel összehasonlítva kevésbé reakcióképes, de rendkívül gyorsan képes reagálni például a nitrogén-oxid gyökkel ($NO^{\bullet}$) (Qiang és mtsai., 2009).

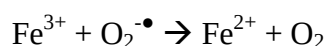


III.4.2. Hidrogén-peroxid

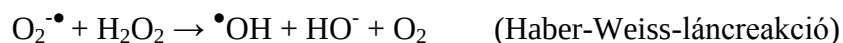
A H_2O_2 a szuperoxid-dizmutáz által katalizált reakció egyik terméke. Mivel párosítatlan elektronnal nem rendelkezik, így nem sorolható a szabad gyökök közé, azonban stabil szerkezete miatt könnyen felhalmozódhat és veszélyessé válhat a sejtekben. Toxikusságának hátterében erőlyes oxidáló tulajdonsága áll, melynek köszönhetően károsítja a fehérjék cisztein és metionin oldalláncát, a telítetlen zsírsavakat, tiolokat, vastartalmú fehérjéket, valamint képes inaktiválni a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz enzimet (Qiang és mtsai., 2009)

III.4.3. Hidroxilgyök

A $\bullet OH$ az egyik legreaktívabb szabad gyök. Pillanatszerűen képes reagálni szénhidrátokkal, aminosavakkal, foszfolipidekkel, nukleotid bázisokkal, szerves savakkal. A $\bullet OH$ a Fenton-reakció során átmeneti fémek (pl.: Fe^{2+}) jelenlétében H_2O_2 -ből keletkezik, mely ellen nincs enzimátikus védekezés, csakis a GSH, illetve az aszkorbinsav képes hatástalanítani (Qiang és mtsai., 2009).



Keletkezésük történhet az ún. Haber-Weiss-láncreakción keresztül is, szuperoxid gyök és H_2O_2 direkt reakciójából.



III.5. Az antioxidáns védelmi rendszer

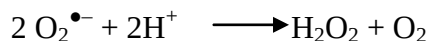
A reaktív oxigén származékok semlegesítése különböző antioxidánsok segítségével megy végbe. Megkülönböztetünk enzimátikus, illetve nem enzimátikus védekező rendszert. A legfőbb antioxidáns enzimek a szuperoxid-dizmutázok (SODs), a kataláz (CAT), a glutation-reduktáz (GR), a glutation-peroxidáz (GPx), a glutation-S-transzferáz (GST) és a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PD). A nem enzimátikus antioxidánsok kisméretű, víz-, és zsírolékony molekulák, mint a GSH, vitaminok (A,C,E,K), karotenoidok (β -karotin, likopin, zeaxantin), flavonoidok (katekin, kvercetin), poliaminok, glutaredoxinok, thiredoxinok (Jamieson, 1998, Carochó és mtsai., 2013).

III.5.1. Nem enzimátikus védelmi rendszer

A sejtek nagy számban tartalmaznak antioxidáns molekulákat, melyek szintén a ROS-ok eliminálásában vesznek részt. A legfőbb ilyen molekula, mely minden élő sejtben megtalálható a GSH (γ -L-glutamil-L-ciszteinilglicin). Bioszintézise során a γ -glutamilcisztein szintetáz ciszteinből és glutamátból γ -glutamilciszteint képez, majd a következő lépésben glicin hozzáadásával a glutation-szintetáz segítségével GSSG szintetizálódik. Antioxidáns funkcióján kívül számos feladatot ellát. Részt vesz az aminosavak transzportjában, detoxifikálási- és kén anyagszere folyamatokban, valamint a nehézfémeket elimináló fitokelatinok prekursoraként is funkcionál (Gazdag, 2008).

III.5.2. Enzimátikus védelmi rendszer

A fémtartalmú szuperoxid dizmutázok (SOD) a $\text{O}_2^{\bullet-}$ semlegesítését végzik. Attól függően, hogy milyen fémet tartalmaznak, illetve hol fordulnak elő, megkülönböztetünk Fe-SOD, Mn-SOD, Cu,Zn-SOD és Ni-SOD enzimeket (Qiang és mtsai., 2009). Az Fe-SOD kizárólag a prokarióta szervezetekre jellemző, de megtalálható bennük az Mn-SOD is. Az eukarióta mitokondriális mátrix csak Mn-SOD-ot tartalmaz, míg a mitokondriális membránok közötti térben, a citoszólban és egyéb sejtorganellekben Cu,Zn-SOD található. Maga az enzim az egyik legjelentősebb antioxidáns, mely a szuperoxid dizmutációját végzi a következő reakción keresztül:



A H_2O_2 semlegesítésére a kataláz és peroxidáz enzimek képesek. A kataláz egy hem prosztetikus csoporttal rendelkező enzim, mely a peroxiszómaiban és glioxiszómaiban a megemelkedett H_2O_2 szintet csökkenti azáltal, hogy a H_2O_2 -ot vízre és oxigénre bontja (Gazdag, 2008). A GPx szintén a H_2O_2 semlegesítését végzi GSH felhasználásával. Ellentétben a CAT-tal, a GPx nem csak a H_2O_2 szintjét képes csökkenteni, hanem a szerves peroxidokét is, mint a *terc*-butil hidroperoxid és kumén-hidroperoxid.

A GPx által katalizált reakcióban glutation diszulfid (GSSG), azaz oxidált GSH keletkezik, miközben megtörténik a ROS-ok semlegesítése. A GSSG redukált formává való visszaalakításáért a GR felel. Működése NADPH-t igényel, melyet a G6PD enzim biztosít a pentóz-foszfát cikluson keresztül. A GST enzim a különböző xenobiotikumokat GSH-hoz való konjugálását végzi (Jamieson, 1998).

III.5.3. Antioxidáns anyagok által indukált oxidatív stressz

Normál körülmények között a szabad gyököket tekintjük prooxidánsoknak, azonban meglepő módon az antioxidáns molekulák is rendelkezhetnek prooxidáns hatással, melynek egyik lehetséges oka a magas koncentráció. Például a β -karotin 1-3 μM -os koncentrációban még védi a DNS-t az oxidatív károsodástól, míg 4-10 μM -os koncentrációban már oxidálja azt. A prooxidáns hatást okozhatja még valamilyen átmeneti fém jelenléte. Példaként említhető az aszkorbinsav, amely vas jelenlétében elektront képes annak átadni, miközben reaktív aszkorbil gyök keletkezik. Az okok közé sorolható még más antioxidánsok jelenléte is. Például az E-vitaminból keletkező gyököt semlegesíti az aszkorbinsav, eközben pedig aszkorbil gyök jön létre (Villanueva és mtsai., 2012).

IV. Célkitűzés

A szakirodalom adatai alapján a linalool oxidatív stresszfolyamatokat indukáló hatással és antioxidáns tulajdonságokkal egyaránt rendelkezik, azonban a prooxidáns hatást tárgyaló publikációkban vagy nem említik a vizsgált sejtek, szövetek életképességét, vagy pedig csak alacsony életképességet tapasztaltak.

Ebből kifolyólag munkánk során célul tűztük ki:

- a linalool szubinhibítori koncentrációjának megállapítását 60 perces akut tesztekben a humánpatogén *C. albicans* élesztőgombán;
- szubinhibítori koncentráció mellett az intracelluláris össz. ROS tartalom megállapítását, valamint a szuperoxid gyök és a peroxidok kvantitatív meghatározását;
- a GSH mennyiségi és az antioxidáns enzimek specifikus aktivitásának mérését;
- a linalool antioxidáns hatásainak és szabadgyökökkel való lehetséges interakcióinak vizsgálatát.

V. Anyag és módszer

V.1. Mikroorganizmus

Vizsgálatainkhoz a *Candida albicans* 33erg⁺, adenin auxotróf törzsét használtuk.

V.2. Törzsfenntartás, rázatott tenyészet készítése, kezelés

A törzs tartós tárolása 4 °C-on történt, melyről hetente friss tenyészetet készítettünk Petri-csészén. Kísérleteinkhez mindig középlogaritmikus fázisú tenyészetet használtunk, melyet 3000 fordulat/perc fordulatszámon (1017 g) 5 percig centrifugáltunk és egyszer mostuk minimál tápoldatban. Minden esetben 10⁷-en sejtet kezeltünk meghatározott koncentrációjú linaloolal (0,125 µl/ml = 0,108 µg/ml = 0,701 mM) egy órán keresztül. A linalool oldószereként etanolt használtunk, melynek végkoncentrációja minden esetben maximum 1% volt és az oldószert a kontroll tenyészetekhez is hozzáadtuk.

V.3. Táptalajok, tápoldatok, pufferek

Komplett táptalaj (YPD):

2 % glükóz, 1 % élesztő kivonat, 2% pepton, 2% agarral kiegészítve táptalaj esetén.

Minimál táptalaj (MM):

1 % glükóz, 0.5 % (NH₄)₂SO₄, 0.1 % KH₂PO₄, 0.05 % MgSO₄ x 7H₂O, 25 µg/ml adenin, 2 µg/ml biotin, 4 µg/ml tiamin, 2% agarral kiegészítve táptalaj esetén.

PMSF-oldat:

PMSF	5 mg
izopropanol	500 µl

CTC oldat:

CuSO ₄ *5H ₂ O	1 g
Na/K tartarát	2 g
Na ₂ CO ₃	100 g
Desztillált víz	1000 ml

SDS oldat:

SDS	2,5 g
Desztillált víz	50ml

NaOH oldat:

NaOH	3,2 g
------	-------

Desztillált víz	100 ml
-----------------	--------

GR puffer (pH : 7,6):

K ₂ HPO ₄	8 g
---------------------------------	-----

KH ₂ PO ₄	0,4 g
---------------------------------	-------

Desztillált víz	500 ml
-----------------	--------

Foszfát puffer:

KH ₂ PO ₄	5 g
---------------------------------	-----

K ₂ HPO ₄	10 g
---------------------------------	------

Desztillált víz	1000 ml
-----------------	---------

Hepes puffer (pH: 7,6):

Hepes	2,383 g
-------	---------

Desztillált víz	500 ml
-----------------	--------

GPx puffer (pH : 7,6):

Tris	1,51 g
------	--------

EDTA	85 mg
------	-------

Desztillált víz	250 ml
-----------------	--------

SOD puffer (pH : 7,8):

DETAPAC	266,5 mg
---------	----------

K ₂ HPO ₄	4,1 g
---------------------------------	-------

KH ₂ PO ₄	220 mg
---------------------------------	--------

Desztillált víz	500 ml
-----------------	--------

GSH puffer (pH : 7,5) :

NaH ₂ PO ₄	6,412 g
----------------------------------	---------

Na ₂ EDTA	5,58 g
----------------------	--------

Desztillált víz	250 ml
-----------------	--------

0,1 M nátrium-foszfát puffer (pH: 7,4):

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	35,8 g
--	--------

NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	15,6 g
---	--------

Desztillált víz	1000 ml
-----------------	---------

V.4. Módszerek

V.4.1. Linalool szubinhibítori koncentrációjának meghatározása

A linalool szubinhibítori koncentrációjának megállapítása pusztítási görbe felvételével történt. Szubinhibítori koncentráció alatt azt a koncentrációt értjük, aminél a kezelést követően a vizsgált sejtek legalább 70-80 %-a szaporodóképes.

A kísérletet megelőző éjjel 100 ml $OD_{595}=0,05$ tenyészetet készítettünk. Másnap, mikor tenyészetünk közép-log fázisba került ($OD_{595}=1,0$) 3000 fordulat/perc fordulatszámra öt percig centrifugáltuk, tápoldatban egyszer mostuk, újra centrifugáltuk a fenti paramétereknek megfelelően, végül beállítottuk a sejtszámot 10^7 -re, majd a mintákhoz hozzáadtuk a linaloolt a megfelelő koncentrációban.

A kezeléseket 2 ml végtérfigatban végeztük az alábbiaknak megfelelően:

Kontroll:	1980 μ l szuszpenzió + 20 μ l etanol,
0,125 μ l/ml	1980 μ l szuszpenzió + 20 μ l linalool a 12,5 μ l/ml-es törzsoldatból,
0,250 μ l/ml	1980 μ l szuszpenzió + 20 μ l linalool a 25 μ l/ml-es törzsoldatból,
1,000 μ l/ml	1980 μ l szuszpenzió + 20 μ l linalool a 100 μ l/ml-es törzsoldatból.

A fenti mintákat 30 °C-on 150 fordulat/percen rázattuk egy órán keresztül. 30 percenként kiszélesztettünk 50-50 μ l-t 1000-szeres kihígítást követően 3-3 Petri-csészére. A 0. percnél történő szélesztésnél a minták linaloolt még nem tartalmaztak, ez a első szélesztést követően került a szuszpenziókhöz, s az egy órás kezelést innen számítottuk. A csészéken lévő telepeket 3 napos inkubálás után leszámoltuk.

V.4.2. Intracelluláris reaktív oxigén származékok mérése (Royall és Ischiropoulos, 1993)

6 ml 10^7 sejt/ml sejtszámú tenyészetet kezeltünk egy órán keresztül 0,125 μ l/ml, 0,250 μ l/ml és 1,000 μ l/ml linaloolal. A kezelési idő leteltével 3000 fordulat/perc fordulatszámra 5 percig centrifugáltuk a sejteket, egyszer mostuk tápoldatban, majd újból felvettük a kiinduló térfogatban. Ezt követően egy órán keresztül festettük 2',7' –diklorofluorescein diacetáttal (DCFDA). Centrifugáltuk és mostuk a sejteket a fenti paraméterek mellett. A kezelt és festett sejteket 4 °C-os, 5%-os szulfoszalicil savval (SSA) 20 percen keresztül feltártuk, feltárás közben pedig gyakran vortexeltünk. A feltárás végeztével 4 °C-on, 10000 fordulat/perc

fordulatszámon 10 percig centrifugáltunk, majd a felülúszóval dolgoztunk tovább. 0,5 ml felülúszóhoz 0,5 ml 2M-os NaOH oldatot adtunk, hogy kompenzáljuk az SSA savas kémhatását, s ez által állítottuk be a festék számára szükséges lúgos pH-t.

Az totál ROS detektálás fluoriméter segítségével, microplate lemezen történt 950 V erősítő feszültséggel, 2,5 nm-es réssel, 502 nm excitációs (gerjesztési) és 523 nm emissziós (detektálási) hullámhossz mellett. Az össz ROS tartalom kvantifikálásának érdekében a festék oxidált formájára, a 2',7' -diklorofluoresceinre (DCF) kalibrációt vettünk fel, az adatokat száraz tömegre vonatkoztattuk. A szignifikancia szint számolása minden kísérlet esetében a kétmintás T-próbával történt.

V.4.3. Szuperoxid gyök koncentráció mérés (Carter és mtsai., 1994)

A szuperoxid gyök koncentráció mérése megegyezik a fent leírt intracelluláris ROS mérés menetével (V.4.2. fejezet), azzal a különbséggel, hogy az itt használt gyökfogó festék a dihydroethidium (DHE), valamint a kalibrációt etídium bromidra vettük fel. A detektálás fluoriméteren, küvettában történt 700 V erősítő feszültséggel, 5 nm-es gerjesztő réssel, 20 nm-es detektálási réssel, 488 nm excitációs és 610 nm emissziós hullámhossz mellett. Az adatokat száraz tömegre vonatkoztattuk.

V.4.4. Peroxid koncentráció mérés (Carter és mtsai., 1994)

A peroxid koncentráció mérés szintén az intracelluláris ROS méréshez (V.4.2. fejezet) hasonlóan történik. A használt jelölő festék a dihydrorhodamine (DHR 123) volt, a kalibrációt pedig rodaminra vettük fel. A mérés küvettában történt fluoriméter segítségével, 700 V erősítő feszültséggel, 5 nm-es gerjesztő réssel, 5 nm-es detektálási réssel, 500 nm excitációs és 525 nm emissziós hullámhossz mellett, valamint az adatokat itt is száraz tömegre vonatkoztattuk.

V.4.5. Linalool indukálta lipidperoxidáció vizsgálata

A lipidperoxidáció mértékének meghatározásához a TBARS (tiobarbitursav reaktív anyagok vizsgálat) tesztet alkalmaztuk.

10 ml, 10^7 db sejt/ml-es *C. albicans* tenyészetet kezeltünk 0; 0,125 μ l/ml és 0,250 μ l/ml linaloollal egy órán keresztül. Ezt követően a tenyészeteket deszt. vízben mostuk, 10 percig centrifugáltuk 10000 fordulat/perc fordulatszámon, 4°C-on, majd felvettük 10 mM EDTA és 10 w/v%-os triklór-ecetsav keverékében. A szuszpenziót 5 percig forraltuk, majd jégen hűtöttük. A fenti paraméterek mellett centrifugáltuk a tenyészetet, majd 0,4 ml

felülúszóhoz 0,6 ml 0,365 w/v%-os tiobarbitursav (TBA) oldatot adtunk (0,05 mM NaOH-ban oldva), majd 20 percig forrásban lévő vízben inkubáltuk. Jégen lehűtöttük az oldatokat, centrifugáltuk a fenti paraméterek mellett és ezt követően 523 nm-en mértük a felülúszó abszorbanciáját (Fekete és mtsai., 2007).

V.4.6. Adaptáció vizsgálata

Az adaptációs kísérlet menete megegyezik az V.4.1. fejezetben ismertetett szubinhibítori koncentráció meghatározás lépéseivel, azzal a különbséggel, hogy itt az eredeti kezelést megelőzően plusz egy órán át kezeltük a sejteket a linalool szubinhibítori koncentrációival (0,125 µl/ml, 0,250 µl/ml).

V.4.7. Minták előkészítése enzimaktivitás méréshez

A közép log fázisú tenyészetet kétszer 5 percig, 3000 fordulat/perc fordulatszámmon, hűtve centrifugáltuk, kétszer foszfát pufferban mostuk, végül felvettük 8 ml foszfát pufferban. A centrifugált mintát 25 ml-es főzőpoharakban -20°C-ra raktuk. Több napi fagyasztást követően feltártuk a sejteket X-press feltárával. A gépet használat előtt ugyan csak behűtöttük legalább 24 órával. Két feltárás között legalább két órát hűtöttük a készüléket. Az X-press-be helyezett mintát további 20 percig együtt fagyasztottuk. A feltárt mintákat a továbbiakban -80°C-on tároltuk.

A mérés napján a mintákat hagytuk felolvadni, majd eppendorf csövekbe mértük őket, melybe előzőleg 50 µl PMSF oldatot mértünk. Ezt követően a mintákat a mérés során végig jégen tartottuk. Hűtött centrifugában 10000 fordulat/perc sebességgel 10 percig centrifugáltunk, majd pedig az így kapott felülúszóval dolgoztunk tovább.

V.4.8. Fehérjetartalom mérése (Peterson, 1983)

A kísérlet végrehajtása során a következő törzsoldatokat használtuk fel: CTC-, SDS-, NaOH oldatok illetve a Folin reagens, valamint A és B reagensok.

A reagens: CTC, SDS és NaOH 1:2:1 arányban; B reagens: Folin reagens és víz 1:5 arányban. A feltárt és kiolvasztott mintákból az előkészítést követően 100 µl-t mértünk 900 µl desztillált vízhez. Annak érdekében, hogy 1 ml deszt. vízben 2-100 µg fehérje legyen még egyszer kihígítottuk a mintákat tízszeresére. Ezekből pedig minden esetben három párhuzamos mintát készítettünk. Ehhez az oldathoz 1 ml A reagenst adtunk, vortexeltük és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Mivel egyszerre több mintával dolgoztunk, ezért a reagensok bemérését stopperrel szabályoztuk. A tíz perc leteltével 0,5 ml B reagenst adtunk az elegyhez

és újabb 20 percig inkubáltuk, majd 750 nm-en fotometráltuk a mintákat. Vakként deszt. vizet, illetve az A és B reagenst tartalmazó oldatot használtunk. A kalibrációhoz BSA oldatot használtunk (0,5 mg/ml koncentrációban) és úgy hígítottuk, hogy végül 25, 50, 75 µg/ml fehérjét tartalmazzanak a minták.

V.4.9. Glutation-reduktáz mérése (Pinto és mtsai., 1984)

Pufferként GR puffert használtunk (összetétel lásd: V.3. fejezet), illetve frissen készítettük a következő oldatokat:

1 mM NADPH: 5 ml pufferben 4 mg NADPH-t oldottunk fel,

10 mM GSSG: 5 ml pufferben 31 mg GSSG-t oldottunk fel.

A mérés során a következő összetevőket mértük össze a következő sorrendben:

100 µl NADPH, 700 µl GR puffer, 150 µl GSSG, 50 µl minta.

1 percen keresztül 340 nm-en fotometráltunk, 3 párhuzamos mintát mértünk és az ezekre kapott eredményt átlagoltuk, az enzimaktivitást pedig ebből számoltuk.

$$\Delta A = \Delta C * d * \epsilon_x$$

Ahol: ΔA : a mérés során az abszorbanciváltozás

ΔC : ezt az értéket keressük, a szubsztrát fogyásának mennyiségét kapjuk meg

d: a kuvetta átmérője (1 cm)

ϵ_x : állandó

$\epsilon_{\text{NADPH}, 340 \text{ nm}}$: $6,3 * 10^6 \text{ cm}^3 (\text{mol cm})^{-1}$

V.4.10. Glutation-S-transzferáz mérése (Warholm és mtsai., 1985)

A méréshez 0,1 M-os foszfát puffert használtunk, illetve frissen készítettük a következő oldatokat:

GSH oldat: 3 ml deszt. vízben 18 mg GSH-t oldottunk fel

CDNB oldat: 3 ml etanolban 20 mg CDBN-t oldottunk fel

A mérés során a következő összetevőket mérjük össze a következő sorrendben:

50 µl CDBN, 800 µl puffer, 100 µl minta, 50 µl GSH.

340 nm-en fotometráltunk 1 percen keresztül, egyszerre 3 párhuzamos mintát mértünk Ezek átlagából számítottuk az enzimaktivitást. A számolás megegyezik a GR mérésének számolásával.

$\epsilon_{\text{GS-DNB}, 340 \text{ nm}}$: $9,6 * 10^6 \text{ cm}^3 (\text{mol cm})^{-1}$

Kataláz mérése (Roggenkamp és mtsai., 1974)

A méréshez 20 mM-os Hepes puffert használtunk , illetve frissen készítettük a következő oldatokat:

A 10 mM-os H_2O_2 törzsoldatot 100 szorosára hígítottuk deszt. vízben, és jégen tartottuk. A mérés során a következő összetevőket mértük össze kvarc küvettában az alábbi sorrendben:

100 μl H_2O_2 , 880 μl puffer, 20 μl enzimkivonat.

240 nm-en fotometráltunk 1 percen keresztül, egyszerre 3 párhuzamos mintát mértünk Ezek átlagából számítottuk az enzimaktivitást. A mérésnél vakot is használtunk, melyet úgy készítettünk, hogy a mintát néhány másodpercig felforraltuk. A számolás megegyezik a GR mérésének számolásával.

$\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2, 240 \text{ nm}}: 4,36 \cdot 10^4 \text{ cm}^3 (\text{mol cm})^{-1}$

V.4.12. Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz mérése (Emri és mtsai., 1994)

A méréshez 20 mM-os Hepes puffert, valamint 200 mM MgCl_2 oldatot használtunk. A mérés napján frissen készítettük az alábbi oldatot:

A oldat: Hepes pufferban feloldottunk 3,15 mg G6P-ot, 7,5 mg NADP-t, hozzáadtunk 2,25 ml MgCl_2 oldatot és feltöltöttük 15 ml-re.

A mérés során a következő összetevőket mértük össze kvarc küvettában az alábbi sorrendben:

900 μl A oldat, 75 μl puffer, 25 μl minta

340 nm-en fotometráltunk 1 percen keresztül, egyszerre 3 párhuzamos mintát mértünk Ezek átlagából számítottuk az enzimaktivitást. A számolás megegyezik a GR mérésének számolásával.

V.4.13. Glutation-peroxidáz mérése (Chiu és mtsai., 1976)

A méréshez készítettünk 50 mM-os Tris/HCL-t és 0,091 mM EDTA-át tartalmazó puffert. Továbbá frissen készítettük az alábbi oldatokat:

1 mM NADPH: 5 ml pufferben 4 mg NADPH-t oldottunk fel,

GSH oldat: 3 ml deszt. vízben 18 mg GSH-t oldottunk fel,

GR oldat: 180 μl deszt. vízben 20 μl enzim szuszpenziót oldottunk fel,

kümén-hidroperoxid oldat (CHP) oldat: 3,3 ml pufferbe 6 μl eredeti CHP oldatot mérünk.

A mérés során a következő összetevőket mértük össze küvettába az alábbi sorrendben:

120 μl NADPH, 400 μl puffer, 20 μl GR, 250 μl GSH, 200 μl minta, 20 μl CHP.

340 nm-en fotometráltunk 1 percen keresztül, egyszerre 3 párhuzamos mintát mértünk Ezek átlagából számítottuk az enzimaktivitást. A számolás megegyezik a GR mérésének számolásával.

V.4.14. Szuperoxid-dizmutáz mérése (Oberlay és Spitz., 1984)

A mérések során SOD puffert használtunk (lásd V.3. fejezet), illetve frissen készítettük az alábbi oldatokat:

A oldat: 5 ml pufferben 9,2 mg NBT-t oldottunk fel és fénytől védve jégen tároltuk,

B oldat: 10 ml pufferben 3,3 mg Xantint oldottunk fel,

C oldat: 18,9 ml pufferhoz hozzámértünk 0,8 ml A oldatot, 5,4 ml B oldatot, illetve 1 mg katalázt. Azt NBT miatt továbbra is fénytől védve, alufóliával letakarva tároltuk a mintát.

D oldat: 2,5 ml pufferban feloldottunk 250 µl Xantin oxidázt.

A mérés során a következő összetevőket mértük össze küvettába az alábbi sorrendben:

800 µl C oldat, 100 µl minta, 50 µl D oldat.

A méréseket 540 nm-en végeztük, és egyszerre 3 párhuzamosat mértünk. Mértünk vakot is, melynél minta nélküli puffert használtunk. Továbbá minden mintánál mértünk egy Xantin oxidáz nélküli mintát is, melyet kivontunk a teljes mérésből, illetve ugyan így kivontuk a vakra kapott értéket is. A számolást a következőképpen végeztük:

1 egység= (vak átlaga/ minta átlaga)- 1

A Mn-SOD mérés során a C oldathoz 5 mg NaCN-ot adtunk, majd 30 percen keresztül fénytől védve inkubáltuk és ezt követően adtuk hozzá a D oldatot.

V.4.15. Redukált glutation és oxidált glutation koncentráció mérése (Anderson, 1995)

15 ml mintát kezeltünk egy órán keresztül 0,125 µl/ml és 0,250 µl/ml linaloollal, centrifugáltunk 3000 fordulat/perc fordulatszámon 5 percig, egyszer mostuk tápoldatban és 1 ml 4°C-os, 5 %-os SSA oldatban vettük fel, erősen vortexeltük. Inkubáltuk 20 percig 4°C-on, majd 10 percig centrifugáltuk 10000 fordulat/perc fordulatszámon, 4°C-on, majd a felülúszóval dolgoztunk tovább. A méréshez a következő puffert készítettük:

100 ml deszt. vízben 1,973 g NaH₂PO₄-ot és 2,232 g Na₂EDTA-t oldottunk fel (pH 7,5).

Frissen készítettük a következő oldatokat, jeges vízben tároltuk őket:

A oldat: 1 ml pufferban 0,248 mg NADPH-t oldottunk fel (mintaszámtól függ a térfogat).

B oldat: 10 mg DTNB-t feloldottunk 5 ml pufferben,

C oldat: 60 µl GR-t 540 µl deszt. vízben oldottunk fel

A minta előkészítése:

GSSG méréshez a feltárt mintából 600 µl-t eppendorfba raktunk, majd hozzáadtunk 12 µl 4-vinilpiridint és 27 µl trietanolamint. A pH-nak 6-7 között kell lennie. Ha túl lúgos volt, akkor adtunk hozzá a mintából, ha túl savas, akkor trietanolamint adtunk hozzá. 1 órán keresztül inkubáltuk a mintát 4°C-on. GSH méréséhez az előbb leírtak szerint készítettük elő a mintát, de nem adtunk hozzá 4-vinilpiridint és nem inkubáltuk.

A mérés során a következő összetevőket mértük össze küvettába a következő sorrendben:

GSH mérésnél: 10 µl minta, 90 µl puffer, 800 µl A oldat, 100 µl B oldat, 20 µl C oldat

GSSG mérésnél: 100 µl minta, 800 µl A oldat, 100 µl B oldat, 20 µl C oldat

A méréseket 412 nm-en végeztük, és egyszerre 3 párhuzamosat mértünk.

V.4.16. Teljes antioxidáns kapacitás mérés ABTS^{•+} gyökkel (Lewinska és mtsai., 2007; Re és mtsai., 1999)

A reakció az ABTS (2,2'-azino-bisz(3-etilbenzotiazolin-6-szulfoninsav) oxidációján alapszik. Az ABTS kálium perszulfáttal reagálva kék színű, fényelnyelésre képes kation gyököt (ABTS^{•+}) hoz létre. Az ABTS^{•+} antioxidáns molekulákkal reagálva újra színtelenné válik, így a reakció fotométerrel nyomon követhető (414 nm). A reakciót Trolox ekvivalens antioxidáns kapacitásnak (TEAC) is nevezik, mivel a kalibrációt Troloxra vesszük fel, ami egy vízzoldékony E-vitamin analóg.

A kísérletet megelőző nap 0,1 M-os nátrium-foszfát puffert készítünk, ezt 4°C-on tároljuk, valamint pufferben feloldjuk az ABTS-t és a K₂O₈S₂-ot. Beoldás után 12-16 órán keresztül sötétben, szobahőmérsékleten tároljuk, majd 1 ml-es adagokban -20 °C-on tároljuk tovább. A kalibrációhoz szükséges 10 mM-os Trolox törzsoldatot frissen készítjük, majd 10-szeresére hígítjuk etanollal. Minden egyes mérés előtt a pufferhez annyi ABTS^{•+} oldatot adunk, hogy az optikai denzitás szigorúan 1,000-1,030 közötti tartományba essen (A₀). A Trolox kalibrációjánál 5-10 µl Troloxot adtunk 995-990 µl ABTS^{•+}-puffer oldathoz, gyors összekeverés után 10 másodperc elteltével mértünk (A₁).

A linalool mellett mértük a GSH antioxidáns kapacitását is. Mindegyik esetben a mintából 10 µl-t adtunk 990 µl ABTS^{•+}-puffer oldathoz, valamint a mérés 1 percen keresztül történt. Külön mértük az oldószerek (etanol, desztillált víz) okozta abszorbancia csökkenést, aminek értékét levontuk a mintáéból. Mind a linalool, mind a GSH esetében a két alkalmazott koncentráció az 1,41 mM és a 0,705 mM volt.

V.4.17. Szuperoxid gyök és linalool közti *in vitro* interakció vizsgálata

A mérés során Oberlay és Spitz (1984) SOD aktivitás méréshez használt módszerét alkalmaztuk.

A mérések során SOD puffert használtunk, illetve frissen készítettük az alábbi oldatokat:

A oldat: 1 ml pufferben 1,84 mg NBT-t oldottunk fel és fénytől védve jégen tároltuk,

B oldat: 5 ml pufferben 1,6 mg xantint oldottunk fel,

C oldat: 10,8 ml pufferhoz hozzámértünk 0,4 ml A oldatot, 1,35 ml B oldatot. Azt NBT miatt továbbra is fénytől védve, alufóliával letakarva tároltuk a mintát.

D oldat: 4,5 ml pufferban feloldottunk 500 μ l xantin oxidázt.

A mérés során a következő összetevőket mértük össze küvettába az alábbi sorrendben:

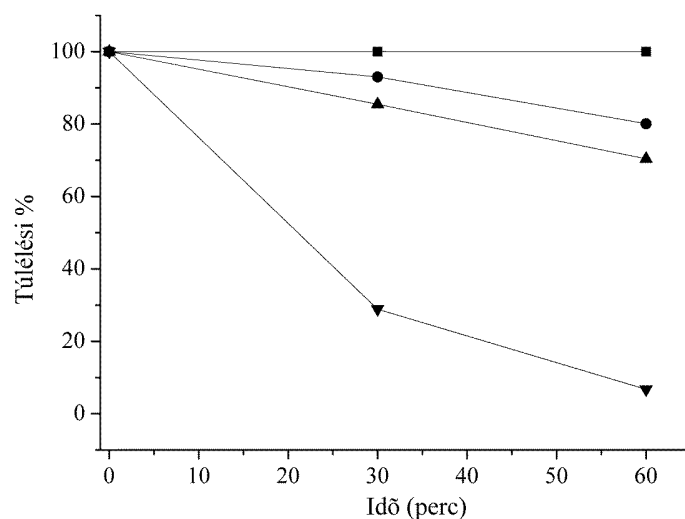
800 μ l C oldat, 90 μ l puffer, 10 μ l minta, 100 μ l D oldat.

540 nm-en egy percen keresztül fotometráltunk 30 másodperces késleltetéssel. Mértünk vakot is, melynél minta nélküli puffert használtunk.

VI. Eredmények és értékelésük

VI.1. A linalool szubinhibítori koncentrációjának megállapítása

A linalool prooxidáns és antioxidáns hatásának eredményes vizsgálatához fontos, hogy a kísérleteket életképes sejtekkel végezzük, így szükségessé vált a linalool szubinhibítori koncentrációjának meghatározása. A pusztítási görbe alapján az 1,0 $\mu\text{l/ml}$ -es linalool kezelés letálisnak bizonyult, 93,3%-os pusztulást tapasztaltunk (2. ábra). A 0,250 $\mu\text{l/ml}$ -es koncentráció esetén az 1 órás kezelést követően 70,4%-os, a 0,125 $\mu\text{l/ml}$ -es koncentrációnál pedig 80,1%-os volt a sejtek túlélése, így a két utóbbit választottuk a szubinhibítori koncentrációknak, és a további kezeléseket is ezekkel a koncentrációkkal végeztük.



2. ábra. *C. albicans* pusztulásának vizsgálata (■) 0, (●) 0,125 $\mu\text{l/ml}$, (▲) 0,250 $\mu\text{l/ml}$ és (▼) 1,0 $\mu\text{l/ml}$ linalool hatására, egy órás kezelést követően.

VI.2. Intracelluláris reaktív oxigén származékok mennyiségi meghatározása

A két szubinhibítori koncentrációval történő 1 órás kezelést követően koncentrációfüggő módon csökkent a sejtek intracelluláris össz. ROS tartalma, illetve hasonló módon változott a $\text{O}_2^{\bullet-}$ szint is. Ezekkel ellentétben a peroxidok szintje 0,125 $\mu\text{l/ml}$ linalool kezelést követően nem változott számottevően, azonban a 0,250 $\mu\text{l/ml}$ -es koncentráció már szignifikáns, 79%-os növekedést okozott (1. táblázat).

A 93,3%-os pusztulást okozó 1,0 $\mu\text{l/ml}$ -es koncentráció esetén a szakirodalommal megegyező, 14,4-szeres össz. ROS növekedést tapasztaltunk, amely feltehetően az

apoptotikusan/nekrotikusan elpusztult sejtekből felszabadult gyököket tükrözi (nincs bemutatva).

Minta	össz. ROS ^a	O ₂ ^{•-b}	Peroxidok ^c
Kontroll	9,76 ± 0,94	0,26 ± 0,05	4,51 ± 0,89
0,125 µl/ml linalool	7,20 ± 0,70**	0,08 ± 0,01**	6,77 ± 1,51
0,250 µl/ml linalool	2,30 ± 0,72***	0,07 ± 0,00***	8,07 ± 1,63*

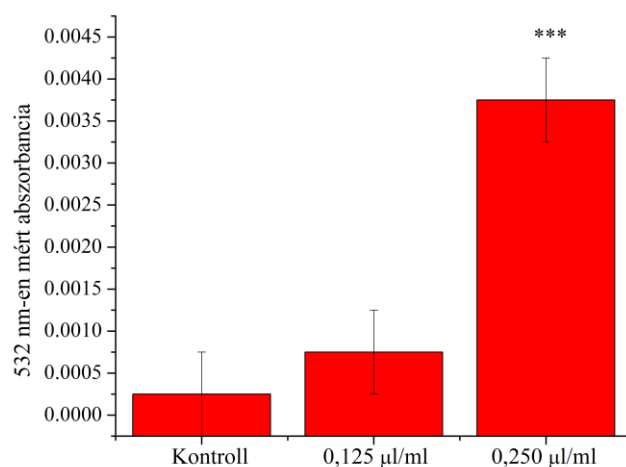
^anmol DCF (mg száraztömeg)⁻¹, ^bnmol etídium-bromid (mg száraztömeg)⁻¹, ^cnmol rhodamine (mg száraztömeg)⁻¹.

p*<5%; *p*<1%; ****p*<0.1%, Student *t*-teszt alapján.

1. táblázat. *C. albicans* kezeletlen, 0,125 µl/ml és 0,250 µl/ml linaloollal kezelt mintáinak összes intracelluláris reaktív oxigén származékok, szuperoxid gyök és peroxid tartalma egy óras kezelést követően.

VI.3. Linalool indukálta lipidperoxidáció vizsgálata

Az 1. táblázatban tárgyalt peroxidok koncentrációváltozásához hasonlóan, a kezeletlen *C. albicans* sejtekhez képest a 0,125 µl/ml-es koncentrációval történő 1 óras kezelés még nem okozott szignifikáns növekedést a lipidperoxidáció mértékében, míg a 0,250 µl/ml linalool esetében több mint 14-szeres emelkedést tapasztaltunk (3. ábra).



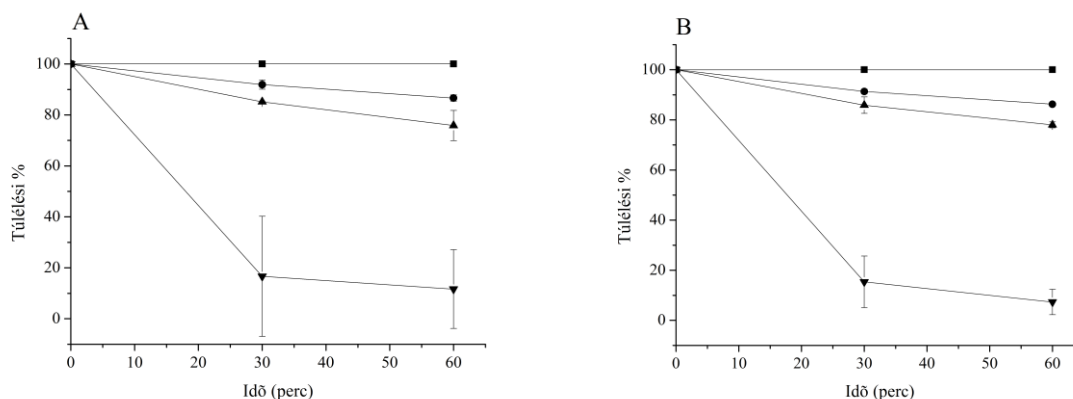
****p*<0.1%, Student *t*-teszt alapján.

3. ábra. *C. albicans* kezeletlen, valamint 0,125 µl/ml és 0,250 µl/ml linaloollal, 60 percig kezelt sejteinek lipidperoxidációs rátája.

VI.4. Adaptáció vizsgálata

A 0,125 µl/ml-es és a 0,250 µl/ml-es linalool koncentrációval történő plusz egy óras előkezelést követően, mindhárom alkalmazott koncentráció esetében az előkezelés nélküli pusztítási görbéhez (VI.1. fejezet) képest enyhe növekedést tapasztaltunk a sejtek túlélésében,

ami a sejtek linaloolal szembeni kismértékű adaptációját feltételezi (4. ábra). Azonban megjegyzendő, hogy a szakirodalom adatainak megfelelően a linalool elsődleges támadáspontja a plazmamembrán. Az általunk alkalmazott 60 perces kezelési idő pedig nem elegendő ahhoz, hogy az adaptációs folyamatok membrán szinten is megnyilvánuljanak. Ehhez több generációs időn keresztül fennálló kezelésre lenne szükség.



4. ábra. *C. albicans* pusztulásának vizsgálata (■) 0, (●) 0,125 µl/ml, (▲) 0,250 µl/ml és (▼) 1,0 µl/ml linalool hatására, 60 perces (A) 0,125 µl/ml-es és (B) 0,250 µl/ml-es előkezelést követően.

VI.5. Antioxidáns rendszer változásainak vizsgálata

A lehetséges adaptáció megnyilvánulását vizsgáltuk az antioxidáns rendszeren keresztül is. Annak ellenére, hogy a két szubinhibítori koncentráció csupán 10%-nyi pusztulásban különbözött, egészen eltérő antioxidáns profilt eredményeztek. A kontroll értékek a normál fiziológias körülmények között képződő ROS-okat kordában tartó antioxidáns aktivitást szemléltetik. A 0,125 µl/ml-es koncentrációval való kezelés hatására bekövetkező drasztikus össz ROS és $O_2^{\bullet-}$ szint csökkenésre reagálva a sejt 53%-kal csökkentette a SOD aktivitást és 22%-kal a CAT enzim aktivitását, annak érdekében, hogy a sejt ne fordítson felesleges energiát a további eliminálásra. A 0,250 µl/ml-es linalool kezelés esetében a peroxid koncentráció és a lipidperoxidáció mértékének emelkedésére reagálva 61%-kal nöött a H_2O_2 -t semlegesítő CAT aktivitása. A szerves és szervetlen peroxidokat semlegesítő GPx aktivitása 316%-kal emelkedett, továbbá a működése során keletkező GSSG visszaredukálásáért felelős GR aktivitása is 3,12-szeres növekedést mutatott. A xenobiotikum-gyök konjugációt végző GST aktivitása 23%-kal csökkent. A kontroll értékekhez képest a GSH szintjében egyik kezelés esetében sem tapasztaltunk szignifikáns változást, míg a GSSG

szint 35%-kal növekedett a 0,250 µl/ml-es linalool kezelést követően, illetve a GSH/GSSG arány 64%-kal lecsökkent, egyértelműen bizonyítva az oxidatív stresszhatást (2. táblázat).

	Kontroll	0,125 µl/ml linalool	0,250 µl/ml linalool
GSH ^a	2,431±0,609	2,490±0,897	2,034±0,215
GSSG ^a	0,078±0,004	0,092±0,056	0,106±0,007***
GSH/GSSG	31,269	29,444	19,074
Total SOD ^b	21,73±6,92	10,19±2,73*	24,78±1,96
SOD _{Mn} ^b	11,41±2,47	9,27±1,07	10,97±1,99
SOD _{CuZn} ^b	12,78±3,65	1,79±2,34**	15,95±4,12
CAT ^c	77,68±1,68	60,51±11,95*	125,38±13,62***
GPx ^d	7,74±1,06	5,43±1,31	24,48±6,98**
GR ^d	126,02±16,63	156,95±24,38	394,07±129,95*
G6PD ^d	645,85±65,38	579,84±32,88	676,26±60,65
GST ^d	11,86±0,38	13,15±1,18	10,08±0,88*

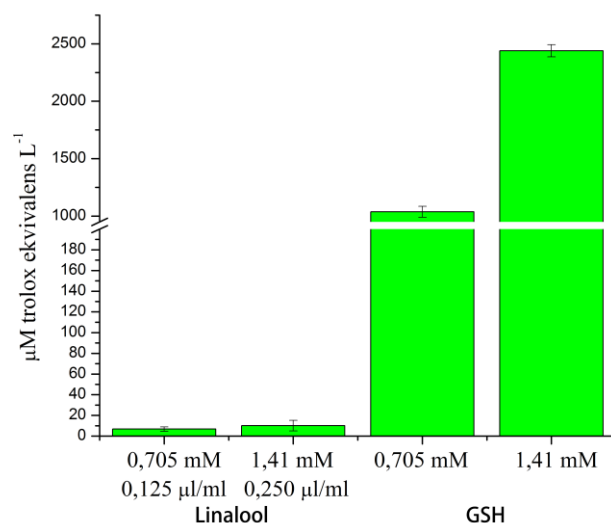
^a Tartalom µM (mg száraztömeg)⁻¹-ben megadva, ^b Specifikus koncentráció egység (perc mg fehérje)⁻¹-ben megadva, ^c Specifikus koncentráció µM (perc mg fehérje)⁻¹-ben megadva, ^d Specifikus koncentráció nM (perc mg fehérje)⁻¹-ben megadva. **p*<5%; ***p*<1%; ****p*<0.1%, Student *t*-teszt alapján.

2. táblázat. GSH és GSSG tartalom, valamint specifikus SOD, CAT, GPx, GR, G6PD és GST koncentrációk 0,125 µl/ml vagy 0,250 µl/ml linaloolal, 60 percen keresztül kezelt *C. albicans* sejtekben.

VI.6. A linalool teljes antioxidáns kapacitásának meghatározása

Az irodalmi áttekintés során (III.3.3.6. fejezet) már bemutatásra került néhány, a linalool antioxidáns hatásait tárgyaló publikáció. Ezeket az eredményeket alátámasztandóan meghatároztuk a linalool teljes antioxidáns kapacitását az ABTS⁺ módszer segítségével. A linalool teljes antioxidáns kapacitását a GSH, mint jól jellemzett antioxidáns molekula antioxidáns kapacitásához viszonyítottuk.

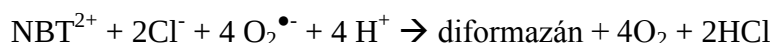
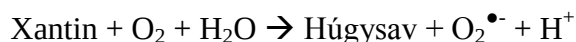
Azt tapasztaltuk, hogy bár a linalool rendelkezik antioxidáns kapacitással, az a GSH-hoz viszonyítva rendkívül alacsony (azonos koncentráció tartományban), több mint 100-ad része csak annak (5. ábra). Mindazonáltal megemlítendő, hogy mérésünk csak egy egy perces kinetikai mérés és nem tükrözi megfelelően az egy órás linalool kezelés során tapasztaltakat, nem tudjuk, hogy a sejtben történik-e valamilyen metabolizációja a linaloolnak, ami felerősítheti az antioxidáns hatásokat.



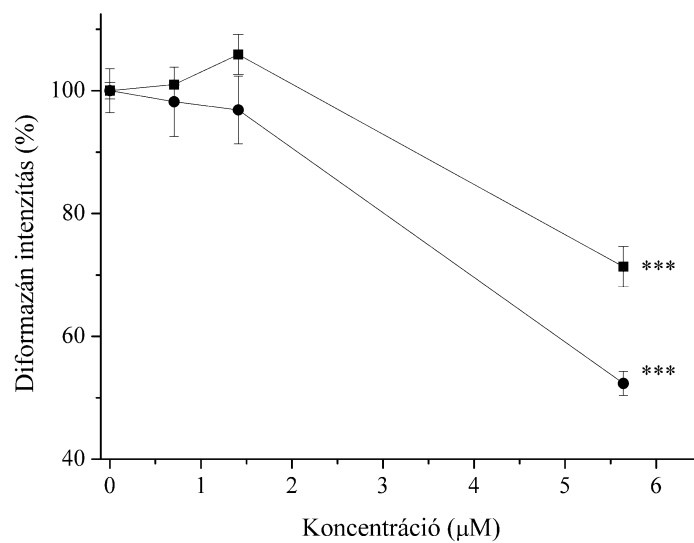
5. ábra. 0,125 μl/ml és 0,250 μl/ml linalool teljes antioxidáns kapacitásának meghatározása az ABTS⁺ módszer segítségével, azonos koncentrációjú GSH-hoz viszonyítva.

VI.7. Szuperoxid gyök és linalool közti *in vitro* interakció vizsgálata

Egy perces *in vitro* interakciós kísérletekben vizsgáltuk a linalool és a O₂^{•-} közötti lehetséges interakciókat. Xantin és xantion oxidáz reakciójával O₂^{•-}-t hoztunk létre, amely NBT-vel reagálva diformazánná alakul (V.4.17. fejezet). A folyamat színváltozással jár, ami 540 nm-en detektálható.



A kísérlet megkezdése előtt felvettük a linalool spektrumát 200 nm és 600 nm között. 540 nm-en a linalool nem rendelkezett elnyeléssel (nincs bemutatva). A linalool mellett, összehasonlításképpen vizsgáltuk a GSH lehetséges interakcióját is. Mindkét esetben koncentráció-függő csökkenést tapasztaltunk az NBT → diformazán átalakulásban. A linalool 5,64 μM-os (1,0 μl/ml) koncentrációja 28%-kal csökkentette az intenzitást, ami közvetve bizonyítja a létrejött interakciót, azonban a 0,705 (0,125 μl/ml) és 1,41 μM (0,250 μl/ml) nem okozott szignifikáns változást. A háttérben a túlzottan alacsony koncentráció állhat, aminek következtében nagyobb eséllyel megy végbe az NBT-gyök reakció, mint a linalool-gyök reakció. Az antioxidáns GSH alacsonyabb koncentrációi 2-3%-os csökkenést okoztak, míg a legmagasabb koncentráció a felére csökkentette az intenzitást, ami szintén az létrejött interakciót bizonyítja (6. ábra).



*** $p < 0.1\%$, Student t -teszt alapján.

6. ábra. 0; 0,705 μM (0,125 $\mu\text{l/ml}$); 1,41 μM (0,250 $\mu\text{l/ml}$) és 5,64 μM (1,0 $\mu\text{l/ml}$) linalool (■), illetve GSH (●) hatása a diformazán intenzitás változásra.

A V.4.11. fejezetben leírt, CAT specifikus aktivitás méréséhez használt módszer felhasználásával vizsgáltuk a linalool— H_2O_2 lehetséges interakcióját is. A módszer a H_2O_2 fogyasztásának detektálásán alapszik. Linalool hatására nem sikerült különbséget detektálnunk, aminek a hátterében az állhat, hogy a mérés 240 nm-en történt, ahol a felvett spektrum alapján a linaloolnak elnyelése van (nincs bemutatva).

VII. Diszkusszió

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy 60 perces akut toxicitási tesztekkel sikerült kimutatni a linalool 0,125 $\mu\text{l/ml}$ -es (80,1%-os túlélés), valamint 0,250 $\mu\text{l/ml}$ -es koncentrációjával (70,4%-os túlélés) történő kezelés hatására bekövetkező koncentrációfüggő csökkenést a sejtek intracelluláris össz ROS és szuperoxid gyök szintjében. A tapasztalt antioxidáns hatást alátámasztja a linalool teljes antioxidáns kapacitás mérésének eredménye, illetve az hogy a GSH-hoz viszonyított alacsony kapacitás ellenére is képes volt a linalool interakcióba lépni a szuperoxid gyökkel.

A 0,250 $\mu\text{l/ml}$ -es linalool már szignifikáns növekedést okozott a peroxidok koncentrációjában és a lipidperoxidáció mértékében, ami a prooxidáns hatást bizonyítja. A majdnem 100%-os pusztulást okozó 1,0 $\mu\text{l/ml}$ -es koncentráció hatására, a szakirodalommal megegyezően szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a totál ROS szintjében, amit vélhetően a sejtek apoptózisa során kiszabaduló reaktív gyökök okoztak.

A linalool szubinhítori koncentrációival történő kezelés nem okozott szignifikáns változást a GSH koncentrációjában. Ezek az eredmények részben ellentmondanak a szakirodalmi adatoknak. Usta és mtsai. (2009) a linalool LD_{50} -es és LD_{100} -as koncentrációjával való kezelést követően 50-80%-os növekedést tapasztaltak az totál ROS szintben, valamint ugyanilyen mértékű csökkenést a GSH szintjében. Az ellentét háttérében feltételezhetően a tenyészetek életképességének különbsége áll.

Kimutattuk, hogy a sejtek adaptációs képességének köszönhetően koncentrációfüggő módon szabályozódott az antioxidáns rendszer. A 0,125 $\mu\text{l/ml}$ -es linalool kezeléssel járó antioxidáns hatás következtében down-regulálódott a SOD és CAT enzim annak érdekében, hogy a sejt ne fordítson további energiát a semlegesítésre. A 0,250 $\mu\text{l/ml}$ -es koncentráció esetében ez a hatás megszűnt, sőt a megemelkedett peroxid koncentrációra és lipidperoxidációra reagálva nőtt a CAT, a GPx és GR enzimek specifikus aktivitása.

Kísérleteink alapján tehát elmondhatjuk, hogy a linalool alacsony koncentrációban erős antioxidáns hatással bír, azonban az emelkedő koncentráció hatására sokkal inkább a prooxidáns hatások érvényesülnek.