

mgr Adriana Piwoni

STRESZCZENIE

Tytuł pracy: Wpływ lipidów rezorcynolowych na stan fizjologiczny i morfologiczny komórek linii HepG2 traktowanych alkoholem etylowym.

Napoje alkoholowe, których głównym składnikiem jest alkohol etylowy, należą do najczęściej stosowanych używek. Sam alkohol etylowy jest związkiem psychoaktywnym, który nie jest obojętny dla zdrowia. Przyczynia się do rozwoju między innymi chorób układu krążenia i cukrzycy oraz chorób układu pokarmowego. Powoduje także uszkodzenia wątroby, która jest szczególnie narażona na szkodliwe działanie etanolu, ponieważ jest głównym miejscem jego metabolizmu. Powstający podczas metabolizmu etanolu aldehyd octowy wykazuje działanie kancerogenne i mutagenne, a wytworzone w reakcji utleniania alkoholu etylowego reaktywne formy tlenu powodują występowanie stresu oksydacyjnego w organizmie. Zwiększa się również poziom czynnika martwicy nowotworu, który inicjuje szlaki wewnątrzkomórkowe prowadzące do śmierci komórki na drodze apoptozy lub nekrozy. W związku z częstym występowaniem alkoholowych chorób wątroby rynek farmaceutyczny skupił się na testowaniu preparatów zwalczających uzależnienie alkoholowe bądź łagodzenia objawów chorobowych i wydłużenie życia chorego. Brak jest jednak związków, szczególnie pochodzenia naturalnego, które zapobiegałyby uszkodzeniom wątroby i chroniły ją przed szkodliwym działaniem alkoholu etylowego. Wydaje się, że jednym z tych związków mogą być lipidy rezorcynolowe.

Lipidy rezorcynolowe są związkami pochodzenia naturalnego, które występują w dużej ilości między innymi w ziarnach zbóż, w szczególności w pszenicy oraz życie. W ziarniakach lokalizują się w okrywie nasiennej, a po obróbce przemysłowej występują w niezmienionej ilości we frakcji otrębowej. Są to związki o potwierdzonej aktywności biologicznej, do której należy między innymi aktywność przeciwdrobnoustrojowa, przeciwgrzybicza czy przeciwbakteryjna.

Celem pracy doktorskiej było określenie wpływu lipidów rezorcynolowych i alkoholu etylowego na komórki wątroby (komórki linii HepG2) oraz sprawdzenie czy związki te mogą chronić wątrobę przed uszkodzeniami spowodowanymi szkodliwym działaniem etanolu.

Lipidy rezorcynolowe wykorzystywane w badaniach pochodziły z otrębów żytnich. Podzielono je na dwie badane frakcje. Pierwsza frakcja stanowiła tak zwany surowy ekstrakt będący mieszaniną homologów nasyconych oraz nienasyconych. Druga frakcja poddana została uwodornieniu i zawierała wyłącznie homologi o nasyconych łańcuchach bocznych. Miało to na celu określenie wpływu stopnia nasycenia łańcucha bocznego na aktywność lipidów rezorcynolowych. Wpływ badanych związków określano za pomocą oceny stanu fizjologicznego i morfologicznego komórek w hodowli. Jako parametry stanu fizjologicznego wybrano ocenę przeżywalności komórek za pomocą pomiaru aktywności dehydrogenazy bursztynianowej przy wykorzystaniu testu MTT; określenie stanu energetycznego komórek poprzez pomiar poziomu ATP; ocenę stanu oksydacyjno – redukcyjnego w komórkach poprzez oznaczenie poziomu powstających reaktywnych form tlenu, poziomu głównych produktów peroksydacji błon komórkowych (TBARS) oraz poziomu glutationu. Zbadano również integralność błony komórkowej poprzez pomiar aktywności uwolnionej z uszkodzonej błony dehydrogenazy mleczanowej. Określono również populacje komórek apoptotycznych i nekrotycznych oraz przeanalizowano rozkład faz cyklu komórkowego. W celu potwierdzenia wyników otrzymanych w testach biochemicznych dokonano również wizualizacji jądra i cytoszkieletu komórkowego oraz występowania apoptozy i nekrozy w badanych komórkach.

Otrzymane w badaniach wyniki potwierdziły hepatotoksyczne działanie alkoholu etylowego w stosunku do komórek wątroby. Etanol obniżał przeżywalność komórek w hodowli, powodował uszkodzenie błony biologicznej objawiającej się zwiększoną aktywnością uwolnionego enzymu z komórek. W badanych stężeniach powodował również areszt komórek w fazie G1 cyklu komórkowego oraz zwiększenie populacji komórek późnoapoptotycznych. Etanol przyczyniał się również do wzrostu ilości reaktywnych form tlenu w badanych komórkach. W tych warunkach eksperymentalnych nie zwiększał jednak stopnia peroksydacji w komórkach, a co więcej wykazywał działanie podobne do antyoksydacyjnego. Zaobserwowano również nieznaczne zmniejszenie poziomu glutationu w komórkach pod wpływem etanolu.

Niskie stężenia lipidów rezorcynolowych pochodzących z obu badanych frakcji nie wykazywały szkodliwego działania na komórki HepG2, lecz podnosiły ich przeżywalność w porównaniu do komórek kontrolnych, którym nie podawano żadnych z badanych czynników. Zaobserwowano również, że najwyższe badane stężenia lipidów pochodzące z surowego ekstraktu oraz z frakcji uwodornionej wykazują stosunkowo silne działanie hepatotoksyczne, które ulegało wzmocnieniu po dodaniu do komórek alkoholu etylowego.

Wyniki wykazały, że lipidy rezorcynolowe w niskich stężeniach, z obu badanych frakcji, podane do komórek przed alkoholem, chronią je przed szkodliwym działaniem etanolu. Wcześniejsza inkubacja z lipidami rezorcynolowymi powodowała ogólne zwiększenie przeżywalności komórek w porównaniu do komórek inkubowanych z samym alkoholem. Dodatkowo lipidy chroniły błonę komórkową przed uszkodzeniem, zmniejszając ilość uwolnionej z komórek dehydrogenazy mleczanowej. Normalizowały również rozkład faz cyklu komórkowego w kierunku rozkładu faz obserwowanego w komórkach kontrolnych. Zaobserwowano zmniejszenie populacji komórek późnoapoptotycznych przy jednoczesnym zwiększeniu populacji komórek prawidłowych. W zastosowanych warunkach eksperymentalnych lipidy zmniejszały również poziom reaktywnych form tlenu w badanych komórkach. Wykazano także, że lipidy rezorcynolowe pochodzące z frakcji uwodornionej wykazują silniejsze działanie ochronne w stosunku do komórek HepG2 w porównaniu do mieszaniny homologów nasyconych i nienasyconych (frakcja niewodorniona).

Słowa kluczowe:

Lipidy rezorcynolowe, alkohol etylowy, HepG2, wątroba, stan fizjologiczny, stan morfologiczny