A Flavin7 hatásai a légutak allergén által előidézett hiperreaktivitására

S. Franova, M. Joskova, E. Novakova, K. Adamicova, M. Sutovska, S. Nosal

https://eurjmedres.biomedcentral.com/articles/10.1186/2047-783X-14-S4-78

Kivonat

Néhány kutatás szerint a polifenol vegyületek csökkenthetik az asztma tüneteinek előfordulását. Kísérletünk célja annak értékelése volt, hogy milyen hatásai vannak a Flavin7 flavonoid 21 napon keresztül történő beadásának a kísérleti úton előidézett légúti gyulladásra ovalbumin-szenzibilizált tengeri malacoknál. Értékeltük a légcső simaizom reaktivitást egy *in vitro* simaizom szalag módszerrel; a légúti ellenállás változásait pedig egy *in vivo* pletiszmografikus módszerrel; a légcső szövet hisztológiai képét; valamint az interleukin 4 (IL-4) és interleukin 5 szinteket (IL-5) a bronchoalveoláris mosó folyadékban (BALF). A légcsőszövet hisztológiai vizsgálatát és az IL-4 és IL-5 gyulladáskeltő citokinek BALF-ban lévő koncentrációit használtuk a légúti gyulladás indexeiként. A Flavin7 beadása a specifikus légúti ellenállás szignifikáns csökkenését okozta hisztamin porlasztást követően és csökkentette a légcső simaizom összehúzódási amplitúdót, válaszul a hörgőszűkület mediátorokra. A Flavin7 minimalizálta a gyulladás fokát, amelyet az eozinofil számítás, valamint az IL-4 és IL-5 koncentrációk alapján becsültünk. Következtetésképpen a Flavin7 beadása hörgőtágító és gyulladásgátló hatásokat mutatott az allergének által előidézett légúti gyulladásra.

BEVEZETÉS

Néhány epidemiológiai kutatás felvetette, hogy az étrendi tényezők, beleértve a polifenol vegyületeket tartalmazó élelmiszerek fogyasztását, csökkenthetik az asztma tüneteinek előfordulását. A flavonoidok, amelyek a polifenolok egyik családja, főleg a gyümölcsökben, a zöldségekben, a vörös borban és a teában találhatóak meg. A flavonoidoknak különböző farmakodinamikai hatásuk van. A légzőszervekben – jól ismert antioxidáns tulajdonságaik mellett – antiallergén, gyulladásgátló és hörgőtágító hatásaik vannak, amelyek néhány kutatás szerint kedvező hatást gyakorolnak az asztmára.

A khellin, a hiszpidulin, a luteolin és az izokvercetin ismertek hörgőtágító hatásukról. A kvercetin és az izokvercetin csökkenti az eozinofil és az IL-5 szinteket a tüdő homogenátban és bronchoalveoláris mosó folyadékban (BALF) az ovalbumin immunizált egereknél. *Sanbongi és munkatársai* megerősítették, hogy a polifenolos fitokemikália, a rozmarinsav szájon át történő beadása gátolta az allergiás reakciót egereknél, feltehetően azáltal, hogy enyhítette a gyulladáskeltő citokinek, kemokinek és az allergén-specifikus antitestek növekedését. Másfelől, vannak más kísérleti és epidemiológiai kutatások, amelyek nem nyújtják egyértelmű bizonyítékát annak, hogy a flavonoidok védenek az asztma és a krónikus köpet termelődéssel szemben.

A jelen kísérletek célja annak értékelése volt, hogyan hat a Flavin7 az allergén által előidézett kísérleti légúti gyulladásra az ovalbumin-szenzibilizált tengeri malacoknál. Ezt a kérdést *in vitro* izomszalag módszerrel; a légúti ellenállásban bekövetkezett változásokat *in vivo* pletiszmográfiás módszerrel; a légcső szövet hisztológiai képével és az interleukin 4 (IL-4) és az interleukin 5 (IL-5) a BALF szintjeit figyelembe véve vizsgáltuk.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kutatást a Jessenius Orvostudományi Fakultás Etikai Bizottsága – Túrócszentmárton, Szlovákia – hagyta jóvá. A tengeri malacokat (200-250 g) véletlenszerűen 3 kísérleti csoportra osztottuk: **1 csoport** – ovalbumin (OVA) szenzibilizált és 21 napig sóoldattal kezelt; **2 csoport** – ovalbumin (OVA) szenzibilizált és 21 napig 2 ml/kg dózisú Flavin7-tel kezelt; és **3. csoport** – kontroll, 21 napig csak sóoldattal kezelve. Az állatok száma mindegyik kísérleti csoportban 10 volt.

Három héttel a szenzibilizációt követően a következő paramétereket vizsgáltuk: légcső simaizom reaktivitás *in vitro* izomszalag módszerrel; a légúti ellenállás változásai egy *in vivo* pletiszmográfiás módszerrel; a légcsőszövet hisztológiai képe; valamint az interleukin 4 (IL-4) és interleukin 5 (IL-5) szintek a BALF-ban.

A Flavin7® a Vita Crystal Slovakia (Szlovákia) ajándéka volt. 10 ml Flavin7® 196 mg flavonoid keveréket és 0.2 mg rezveratrolt tartalmazott. Az OVA-t (tojás albumin, III-as fokozatú), a hisztamint, az acetilkolint a Sigma Chemicals-tól (Németország) vásároltuk. Az egér IL-4, IL-5 ELISA kiteket a protein array rendszerekhez a BioTech X-ray-től (St. Louis, MO) vásároltuk.

A TENGERI MALACOK SZENZIBILIZÁLÁSA

Hím Trik tengeri malacokat (200-250 g) aktívan szenzibilizáltunk ovalbumin beadásával. Öt milligramm OVA-t 1 mg alumínium hidroxiddal beinjektáltunk intraperitoneálisan, 5 mg OVA-val szubkután 1 ml sóoldatban az első napon. Ezt követően a tengeri malacokat 21 napig kezeltük három naponként megismételt intraperitoneális injekcióval és OVA hatásának tettük ki (1 % 0.9 % steril nátrium kloridban) egy aeroszol kamrában az utolsó 6 napon minden nap.

A LÉGÚTI REAKTIVITÁS ÉRTÉKELÉSE

In vitro, a légcső simaizom reaktivitását becsültük légcsőcsík preparátumokban. 20 ml-es szervkamrába helyeztük őket, amely Krebs-Henseleit puffert tartalmazott és 36.5 ± 0.5 ^{o}C-on és amit pH 7.5 ± 0.1-en tartottunk, amelyet folyamatosan 95 % O_2 és 5 % CO_2 keverékével szellőztettük. A légcsőizom csíkoknak a hisztamin (10^{-8} – 10^{-3} mol/l) és az acetilkolin (10^{-8} – 10^{-3} mol/l) kumulatív dózisaira válaszul adott kontrakciójának amplitúdóját (mN) használtuk a légcső simaizom reaktivitás indexeként.

In vivo, a légúti reaktivitást egy kétkamrás, teljes test pletiszmográfot (Rodents Double-Chamber Plethysmograph, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Németország) használva értékeltük. A specifikus légúti ellenállást és annak a hörgőszűkítést közvetítő mediátor, a hisztamin – 10^{-6} mol/l sóoldatban – rövid (2 perc) inhalációját követő változásait tekintettük a reaktivitás indikátorainak. Összehasonlításra a sóoldatporlasztását követő reaktivitást használtuk. Minimálisan 5 perces szünet volt a hatásoknak való kitettségek között, amelyeknek során friss levegőt fújattunk be az orrüregbe.

A GYULLADÁSKELTŐ CITOKINEK MÉRÉSE

A bal tüdőt 0.9 %-os NaCl-lel (37°C) (2x10 ml/kg) átmostuk, és a BALF-ot 10 percen keresztül 1500-as percenkénti fordulattal centrifugáltuk. A felülúszót félretettük a későbbi biológiai elemzésekhez. A BALF-ban lévő IL-4-et és IL-5-öt ELISA módszerrel, a kereskedelemben elérhető kitekkel határoztuk meg (BioTech X-Ray, St. Louis, MO). A citokinek minimálisan kimutatható szintje kevesebb, mint 1 pg/ml volt.

HISZTOLÓGIAI VIZSGÁLAT

A légcsövet 4 %-os pufferelt formaldehidben fixáltuk. A metszeteket ezután megfestettük hematoxilinnel és eozinnal a fénymikroszkópos vizsgálathoz. A gyulladás fokát eozinofil számolás alapján becsültük (enyhe – 20-ig; közepes – 50-ig; erős – 50 felett).

ADATELEMZÉS

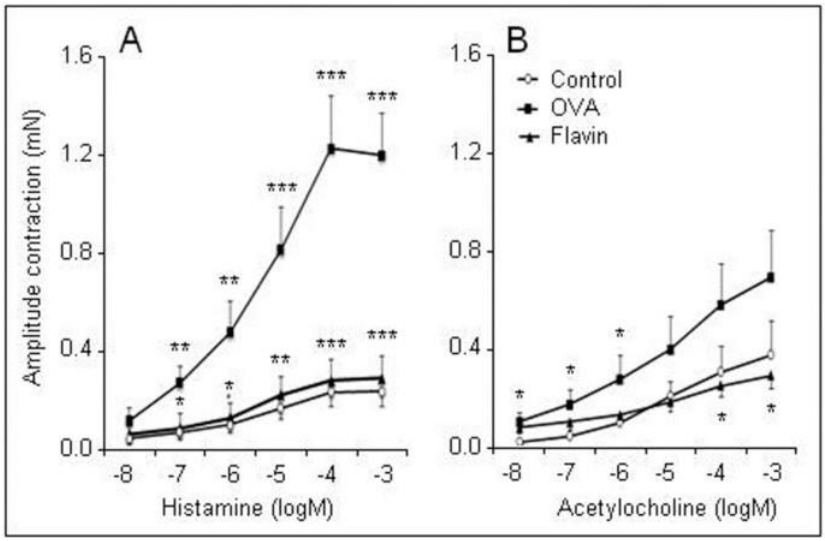
Minden eredményt középérték ± SE-ként [standard hiba] fejeztünk ki. A statisztikai elemzést egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük el. Az eltéréseket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a P alacsonyabb volt, mint 0.05.

EREDMÉNYEK

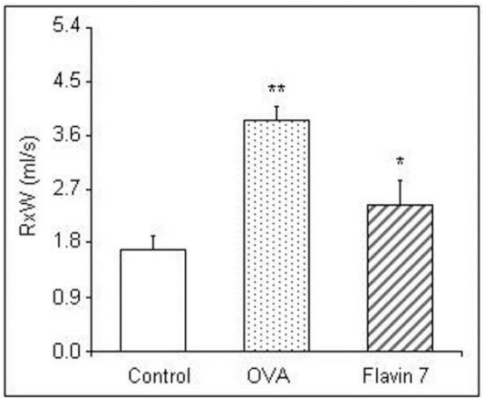
Az OVA-szenzibilizált tengeri malacok 3 hétig tartó Flavin7-tel történt kezelése gátolta a hisztamin (**1A ábra**) és acetilkolin (**1B ábra**) kumulatív dózisával előidézett összeszűkülést. A kezelés szignifikáns csökkenést idézett elő a specifikus légúti ellenállásban is a hisztamin beporlasztást követően (**2. ábra**), és jelentősen csökkentette az IL-4 (**3A ábra**) és az IL-5 (**3B ábra**) szinteket a BALF-ban.

1. ábra –A légcső simaizom összehúzódás amplitúdójának változásai a hisztamin (A panel) és az acetilkolin (B panel) hatására 21 napos Flavin7-tel történt kezelést követően az ovalbuminnal (OVA) szenzibilizált tengeri malacoknál.

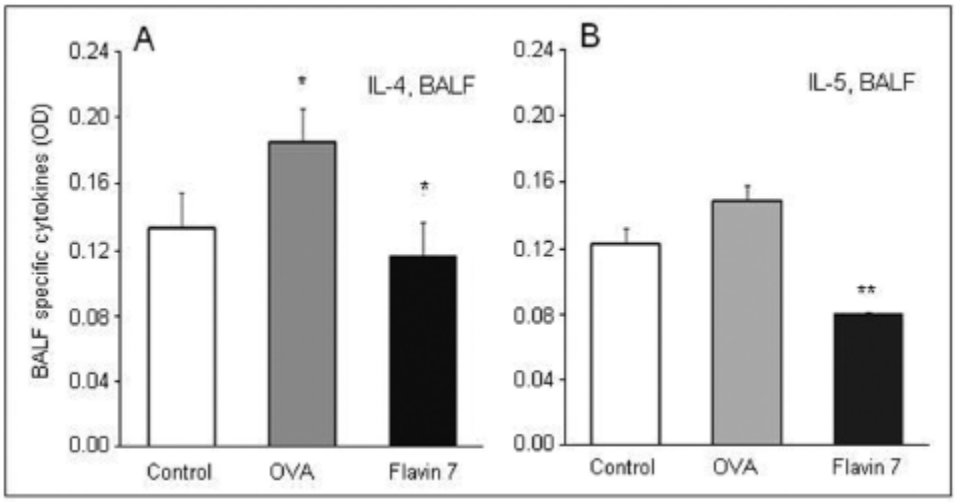
Kontroll csoport (csak sóoldattal kezelt tengeri malacok); OVA-szenzibilizált csoport (tengeri malacok 21 napos OVA kezelés után); OVA-szenzibilizált Flavin7-tel kezelt csoport (OVA-szenzibilizált, 21 napig Flavin7-tel kezelt tengeri malacok). Az adatok középértékek ± SE; n = 10 mindegyik csoportnál; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.



2. ábra – A specifikus légúti rezisztencia összehasonlítása a hisztamin (10^{-6} mol/l) inhalációt követően a kontroll, az OVA-szenzibilizált és a Flavin7-tel kezelt OVA-szenzibilizált tengeri malacok csoportjában. Az adatok középértékek ± SE; n = 10 mindegyik csoportra; $^{*}P < 0.05$ és $^{**}P < 0.01$.



3. ábra – A BALF-ban lévő IL-4 (**A panel**) és az IL-5 (**B panel**) gyulladáskeltő citokinek összehasonlítása a kontroll, az OVA-szenzibilizált és az OVA-szenzibilizált Flavin7-tel kezelt tengeri malacok között. Az adatok középértékek ± SE; n = 10 minden csoportra; $^{*}P < 0.05$.



A tengeri malacok légcső váladékának hisztológiai vizsgálata az OVA szenzibilizációt követően az epitélium és a submucosa eozinofil beszűrődését tárta fel. A sóoldattal kezelt OVA csoportnál a gyulladás foka a következő volt: 3 x enyhe és 4 x közepes. Az eozinofilok felgyülemlése mikrotályogokat hozott létre az epitéliumban. Ezzel ellentétben a Flavin7-tel kezelt OVA csoportnál az eozinofil beszűrődések részleges felbontása történt meg úgy, hogy a gyulladás foka 3x enyhére és 1x közepesre csökkent.

TÁRGYALÁS

Az allergiás asztma a légutak krónikus gyulladásos betegsége. Az allergiás asztmát jellemző tulajdonságok közé tartoznak az allergén által kiváltott korai és késői hörgő obstruktív reakciók, a légutak gyulladása és a légutak falának szerkezeti változásai, amelyekhez a légutak hiperreszponzivitása (AHR/airway hyperresponsiveness) és a tüdőfunkció progresszív hanyatlása társul.

Az AHR-t úgy határozzák meg, mint a légutak túlzott obstruktív reakcióját egy sor farmakológiai, vegyi és fizikai ingerre. A jelen tanulmányban megállapítottuk, hogy a Flavin7 képes minimalizálni az AHR-t. A Flavin7 csökkentette az összehúzódás amplitúdóját a hisztaminra és acetilkolinra adott válaszként az OVA szenzibilizált tengeri malacokból preparált légcső simaizom csíkokban. A Flavin7 kezelés továbbá szignifikáns csökkenést eredményezett a specifikus légúti ellenállásban a hisztamin porlasztás során, amit teljes test pletiszmográffal mértek.

A gyulladásos változásokhoz az allergiás reakció során az IgE megemelkedett szintjei kapcsolódtak, ami hízósejt aktivációt okozott. Az ebben szerepet játszó immunológiai folyamatokat a Th2 limfociták proliferációja és aktivációja jellemzi. A Th2 által közvetített allergiás gyulladást olyan citokinekkel érjük el, mint az IL-4 és az IL-13 a B limfociták irányításában és az IgE szintetizálásában betöltött szerepe miatt, az IL-5 az eozinofilok érésében és aktivációjában játszott szerepe miatt, valamint az IL-3 és az IL-10 a hízósejt létrehozásában játszott szerepével. Úgy tűnik, hogy a Flavin7 kezelés képes enyhíteni az IL-4 és az IL-5 citokinek gyulladáskeltő növekedését. A Flavin7 hörgőtágító és gyulladásgátló

tulajdonságai rámutatnak annak lehetőségére, hogy kiegészítő terápiás opció legyen a légúti hiperreakcióban asztmás alanyoknál. Összefoglalva: a jelen kutatás arra utal, hogy a Flavin7-tel történő tartós kezelésnek védő hatása van az allergiás gyulladással kapcsolatos légúti hiperreakcióra.