

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**dr. Csépanyi Evelin**

**Természetes eredetű anyagok toxicitásának és  
kardiovaszkuláris hatásainak vizsgálata**

**DEBRECENI EGYETEM**

**GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2016**

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Természetes eredetű anyagok toxicitásának és  
kardiovaszkuláris hatásainak vizsgálata**

**dr. Csépanyi Evelin**

**Témavezető: Dr. Bak István**



**DEBRECENI EGYETEM**

**GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2016**

## Tartalomjegyzék

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	<b>1</b>
<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	<b>3</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS ÉS CÉLKITŰZÉSÜNK</b> .....	<b>6</b>
2.1 NÖVÉNYEK, NÖVÉNYI EREDETŰ HATÓANYAGOK VIZSGÁLATA TÖBBFÉLE ASPEKTUSBÓL...	6
2.2 OXIDATÍV STRESSZ ÉS SZABADGYÖKÖK A SZERVEZETBEN .....	7
2.3 ANTIOXIDÁNSOK, ANTIOXIDÁNS TARTALMÚ NÖVÉNYEK A KUTATÁSOK KÖZÉPPONTJÁBAN .....	8
2.3.1 <i>Csonthéjas növényi mag-drogok</i> .....	12
2.3.2 <i>Karotinoidok, a béta-karotin</i> .....	15
2.4 NÖVÉNYI EREDETŰ HATÓANYAGOK ÉS AZ OXIDATÍV STRESSZ.....	17
2.5 ANTI- ÉS PROOXIDÁNSOK .....	18
2.6 CÉLKITŰZÉSÜNK.....	19
<b>3. ANYAG ÉS MÓDSZER</b> .....	<b>20</b>
3.1. MEGGYMAGBÉL KIVONAT TOXICITÁSÁNAK VIZSGÁLATA .....	20
3.1.1. <i>Meggymagbél kivonat preparálása</i> .....	20
3.1.2. <i>Kísérleti állatok</i> .....	20
3.1.3. <i>Kezelési protokoll</i> .....	20
3.1.4. <i>Orális toxicitási vizsgálatok (Részben önálló munka)</i> .....	21
3.1.5. <i>Makroszkópikus vizsgálat</i> .....	21
3.1.6. <i>Szérum metabolitok és enzim aktivitások meghatározása (Részben önálló munka)</i> .....	21
3.1.7. <i>Hisztopatológiai/mikroszkópos vizsgálat</i> .....	22
3.1.8. <i>Bőr toxicitási vizsgálatok (Részben önálló munka)</i> .....	23
3.1.9. <i>Fényvédelem/fototoxicitási vizsgálatok (Részben önálló munka)</i> .....	23
3.1.10. <i>Statisztikai analízisek</i> .....	23
3.2. BÉTA-KAROTIN KARDIOVASZKULÁRIS HATÁSAINAK VIZSGÁLATA.....	24
3.2.1. <i>Kísérleti állatok</i> .....	24
3.2.2. <i>Állatcsoportok és béta-karotin kezelés (Önálló munka)</i> .....	24
3.2.3. <i>Iszkémia-reperfúzió és izolált dolgozó szív</i> .....	24
3.2.4. <i>Szívfunkció mérések (Részben önálló munka)</i> .....	25
3.2.5. <i>Infarktusos terület mérése (Részben önálló munka)</i> .....	25

3.2.6. Szív HO-1 szintjének Western blot analízise (Önálló munka).....	25
3.2.7. MTT sejt életképesség vizsgálat béta-karotin citotoxicitásra.....	26
3.2.8. Szöveti Antioxidáns Kapacitás (TAC) meghatározása (Önálló munka) .....	27
3.2.9. Statisztikai analízis.....	27
<b>4. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>28</b>
4.1. MEGGYMAGBÉL KIVONATTAL VÉGZETT KÍSÉRLETEK EREDMÉNYEI.....	28
4.1.1. Makroszkópikus vizsgálatok .....	28
4.1.2. Szérum metabolit és enzim aktivitás vizsgálat eredményei .....	28
4.1.3. Szövetpatológiai vizsgálatok eredményei.....	29
4.1.3.1 A vese hisztopatológiai vizsgálata .....	29
4.1.3.2. A máj hisztopatológiai vizsgálata .....	31
4.2. MEGGYMAGBÉL OLAJJAL VÉGZETT VIZSGÁLATOK.....	32
4.2.1. Bőr toxicitási vizsgálatok .....	32
4.2.2. Meggymagbél olaj hatása UV sugárzás okozta károsodások kivédésére .....	33
4.3. BÉTA-KAROTINNAL VÉGZETT KÍSÉRLETEK EREDMÉNYEI.....	34
4.3.1. Béta-karotin kezelések hatása a szívfunkciókra, iszkémia/reperfúzió átesett izolált szívekben .....	34
4.3.2. A béta-karotin hatása az iszkémia/reperfúzió okozta infarktusos terület nagyságára és a szöveti antioxidáns kapacitásra (TAC).....	36
4.3.3. A béta-karotin hatása a hem-oxigenáz-1 (HO-1) fehérje expresszióra .....	37
4.3.4. Béta-karotin citotoxicitásának vizsgálata .....	39
<b>5. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>40</b>
<b>6. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>46</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>47</b>
<b>8. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>48</b>
<b>9. TÁRGYSZAVAK .....</b>	<b>62</b>
<b>10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>63</b>
<b>11. FÜGGELÉK .....</b>	<b>64</b>

## Rövidítések jegyzéke

<b>ABTS</b>	2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, 2,2'-azinobisz-3-ethylbenzotiazolin-6-szulfonsav
<b>AF</b>	aorta flow, aorta kiáramlás
<b>AlkFosz</b>	alkaline phosphatase, alkalikus foszfatáz
<b>BC</b>	beta-carotene, béta-karotin
<b>BCA</b>	bicinchoninic acid, bikinkoninik sav
<b>BL</b>	baseline, alapvonal
<b>BUN</b>	blood urea nitrogen, vér karbamid nitrogén
<b>CAT</b>	catalase, kataláz
<b>CF</b>	coronary flow, koronária átáramlás
<b>CO</b>	cardiac output, kardiális kiáramlás (perctérfogat)
<b>DPPH</b>	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil,
<b>dSV</b>	decline of stroke volume, verőtérfogat változás
<b>EDTA</b>	ethylenediaminetetraacetic acid, etilén-diamin-tetraecetsav
<b>FBS</b>	fetal bovine serum, magzati marha szérum
<b>FRAP</b>	ferric reducing ability of plasma, vasredukálóképesség
<b>GAPDH</b>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz
<b>GOT</b>	glutamic oxaloacetic transaminase, glutamát-oxálacetát-transzamináz
<b>GPT</b>	glutamic-pyruvate transaminase, glutamát-piruvát-transzamináz
<b>GPX</b>	glutathione peroxidase, glutation-peroxidáz
<b>HAS2</b>	hyaluronan-synthase 2, hialuronán-szintáz 2
<b>HE</b>	haematoxylin-eosin, hematoxylin-eozin
<b>H9c2 sejtek</b>	cardiomyoblast cells, kardiomioblaszt sejtek
<b>HO-1</b>	heme oxygenase-1, hemoxigenáz-1
<b>HRP</b>	horse radish peroxidase, torma peroxidáz
<b>LC-MS-MS</b>	liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry, folyadék kromatográfia-tömegspektrométer-tömegspektrométer
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid
<b>NE/l</b>	international unit/liter, nemzetközi egység/liter

<b>ORAC</b>	oxygen radical absorbance capacity, oxigényök megkötő kapacitás
<b>PBS</b>	phosphate-buffered saline, foszfát pufferelt sóoldat
<b>PGR</b>	progesterone receptor, progeszteron receptor
<b>PMSF</b>	phenylmethane sulfonyl fluoride, fenilmetilszulfonil-fluorid
<b>rpm</b>	revolutions per minute, percenkénti fordulatszám
<b>SCSE</b>	sour cherry seed extract, meggy magbél kivonat
<b>SDS-PAGE</b>	sodium-dodecyl-sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gél elektroforézis
<b>SEM</b>	standard error of mean, középérték közepes hibája
<b>SOD</b>	superoxide dismutase, szuperoxid-dizmutáz
<b>SV</b>	stroke volume, verőtérfogat
<b>SVvált</b>	stroke volume decline, verőtérfogat változás
<b>ttkg</b>	bodyweight kilogramm, testtömeg kilogramm
<b>TAC</b>	total antioxidant capacity, totál antioxidáns kapacitás
<b>TBST</b>	tris buffered saline with Tween 20, trissel pufferelt sóoldat Tween 20-al
<b>TEAC</b>	trolox equivalent antioxidant capacity, trolox ekvivalens antioxidáns kapacitás
<b>TTC</b>	triphenyl-tetrazolium-chloride, trifenil-tetrazólium-klorid

## 1. Bevezetés

Napjainkban nemcsak Magyarországon, de világszerte is a szív- és érrendszeri megbetegedések a vezető halálokok között szerepelnek a rosszindulatú daganatos betegségek mellett. A kardiovaszkuláris megbetegedéseken belül a leggyakrabban előforduló kórképek a szív iszkémiás betegségei és a heveny szívizom elhalás a magyar statisztikai adatok alapján is [1]. Ezen kórképek kialakulásának főbb kockázati tényezői a magas vérnyomás, diszlipidémia, diabétesz mellitusz, obezitás, dohányzás, valamint nem befolyásolható tényezőkként a kor és a családi halmozódás [2].

A kiemelt rizikófaktorok körébe tartozó obezitás, a mai modern világ fejlett országainak egyik legnagyobb megoldandó egészségügyi problémája. A Worldometers valódi idejű világstatisztika 2016.01.29-i adatai alapján (1. táblázat) és egyszerű számításom szerint a Föld teljes népességének mintegy 29%-a vagy túlsúlyos vagy kövér [3]. Ezekbe a súlykategóriákba tartozó embereknél, bizonyítottan nő a szív- és érrendszeri megbetegedések előfordulási gyakorisága, természetesen ezen túlmenően számos egyéb betegség kialakulásának veszélye is, mint például I-II típusú diabétesz, hiperkoleszterinémia, magas vérnyomás stb.

### 1. táblázat: Valódi idejű világstatisztikai adatok [3]

<b>Kategóriák</b>	<b>Számadatok</b>
Jelenlegi világnépesség	7 398 189 911
Túlsúlyos emberek a világban	1 620 297 843
Kövér emberek a világban	540 099 284
Kövérséggel kapcsolatos betegségekre ma költött pénz az USA-ban	\$ 302 213 303
Súlycsökkentő programokra ma költött pénz az USA-ban	\$ 116 010 107

**Forrásadatok:** <http://www.worldometers.info/hu/2016.01.29>. 14óra 40perc

Az Amerikai Egyesült Államokban, az 1. táblázat számadatainak bizonyító ereje kapcsán is, dollár milliárdokat fordítanak a kövérséggel kapcsolatos betegségek kezelésére, valamint súlycsökkentő programokra, mint preventív terápiára.

A prevenció fontosságát, bármely betegséggel kapcsolatban, nem lehet eléggé hangsúlyozni, én a jövő terápiájának nevezném személy szerint, bár nyilván nem minden betegséget lehet megelőzni, de a késleltetés is rendkívül fontos tényező. Ezzel ellentmondásban a magyar állami kiadások prevencióra fordított értéke az összes egészségügyi kiadáshoz viszonyítva fordított arányú változást; csökkenő tendenciát mutat a 2003 és 2012-es évek között a KSH statisztikai adatai alapján (2. táblázat).

Míg az inflációval körülbelül megegyező mértékben nőnek az állami egészségügyi kiadások, addig ettől jóval nagyobb mértékben csökkent a vizsgált időintervallum alatt a prevencióra fordított állami kiadások értéke. Szintén megfigyelhető, hogy az állam kontra háztartási és egészségpénztári kiadások változása a háztartások felé mutat pozitív elmozdulást [4].

**2. táblázat:** Egészségügyi kiadások alakulása (2003–2012) a KSH adatai alapján

Megnevezés	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<b>Állami kiadások összesen</b>	<b>1 141,4</b>	<b>1 182,2</b>	<b>1 302,3</b>	<b>1 364,1</b>	<b>1 289,9</b>	<b>1 328,3</b>	<b>1 302,1</b>	<b>1 384,4</b>	<b>1 415,1</b>	<b>1 385,8</b>
gyógyszer	271,5	283,3	347,3	378,6	305,0	301,9	312,0	321,9	332,6	271,0
prevenció és népegészségügyi ellátás	51,1	49,0	52,9	53,1	49,5	50,8	47,6	52,1	43,0	35,3
<b>Háztartások és egészségpénztárak összesen</b>	<b>419,0</b>	<b>441,9</b>	<b>485,4</b>	<b>503,7</b>	<b>526,3</b>	<b>551,2</b>	<b>555,9</b>	<b>619,1</b>	<b>659,6</b>	<b>690,2</b>
gyógyszer	157,1	170,3	195,6	195,6	242,5	271,0	281,5	297,8	332,8	346,6
gyógyászati segédeszközök és egyéb tartós és nem tartós gyógyászati célú fogyasztási cikkek	28,1	29,8	30,4	35,1	36,2	34,3	29,3	32,1	31,0	34,1
<b>Egészségügyi kiadások összesen</b>	<b>1 605,7</b>	<b>1 698,5</b>	<b>1 859,6</b>	<b>1 955,2</b>	<b>1 917,8</b>	<b>1 980,9</b>	<b>1 982,4</b>	<b>2 136,6</b>	<b>2 219,3</b>	<b>2 209,0</b>

**Források:** [https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat\\_eves/i\\_fec001.html](https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_fec001.html)

Mindezekből következik, hogy számos egyéb tényező befolyásoló hatása mellett egyértelmű tendencia a háztartásokra egyre nagyobb mértékben nehezedő preventív terápiás lehetőségek okozta többlet költségek megjelenése. Tehát a háztartásokra és egészségpénztárakra háruló anyagi terhek enyhítése a cél, melynek eszköze lehet a megfelelő minőségű és árértékű táplálékkiegészítők körének bővítése, és ezek mindennapi használata.

Ehhez kapcsolódóan említést kell tennünk a média formáló és informáló erejéről, mely a fő kommunikációs csatornája a hatékony marketingnek, és egy táplálékkiegészítőt elindíthat útján és sikerre vihet.

A prevenció részeként a táplálékkiegészítőkhöz kötődően a komplex egészséges életmódról is beszélni kell, melynek részét képezi az egészséges táplálkozás, a testmozgás valamint a lelki egyensúly. A mai kor emberének alkalmazkodnia kell az idők folyamán kialakult élethez. Gondolok itt a mozgás beiktatására rohanó mindennapjainkba, a stressz kezelésére és legfőképp a tápanyagainkban, táplálékunkban található vitaminok, ásványi anyagok, nyomelemek, rostanyagok kiegészítésére, pótlására. Ennek leghatékonyabb eszközei a táplálékkiegészítők, melyeknél nagyon fontos a minőség, a megfelelő formulálás, és a már korábban említett ár, valamint a marketing.

Elmondhatjuk, hogy most éljük a táplálékkiegészítők korát, amikor is jellemző a túlhasználát és a nem megfelelő, akár ártalmas készítmények választása, fogyasztása is. Rengeteg természetes eredetű hatóanyagot tartalmazó terméket kínálnak a gyógyszertárak, drogériák és az internetes áruházak, melyeket megfelelő tudományos adatok és megalapozottság nélkül alkalmazunk. A kutatói társadalomnak igazodnia kell a kezében lévő tudás hozzáadásával, a jövő hatékonyabb és az emberi szervezetre nem káros hatóanyagainak a felderítésével, ezek részletes vizsgálatával, melynek eredményeképpen biztonságosan használható táplálékkiegészítők fejleszthetők, vagy nem toxikus hatóanyagszintek meghatározhatók. Az egyik legkézenfekvőbb a környezetünkben lévő milliányi természetes eredetű hatóanyag vizsgálata, melyekhez könnyen hozzájutunk ellentétben a molekulatervező programok végeredményeképpen szintetizált potens hatóanyag jelöltekkel. Mindig nagyobb kihívás egy élőből származó minták vagy komplex élő rendszert vizsgálni, gondolok itt a különféle növényi extraktumokra, melyek biohasznosulása messze túlmutat egy szintetikus monokomponenshez képest. A trendeket követve, miszerint egyre nagyobb érdeklődést mutatunk a természetes eredetű hatóanyag tartalmú készítmények iránt mind preventív, mind terápiás céllal; valamint a világot kiemelt mértékben sújtó szív- és érrendszeri megbetegedések okán, kutatócsoportunk többek között a meggy-magbél kivonat és a béta-karotin élő szervezetre gyakorolt hatásait is vizsgálja.

Korábbi kutatómunkánk folytatásaként, ahol a természetes eredetű meggy-magbél kivonat összetételét, kardiovaszkuláris és retinára kifejtett hatásait vizsgáltuk, e téma következő állomásaként további toxikológiai vizsgálatoknak tettük ki ezt a komplex növényi származékot, ezt követően pedig a béta-karotin élő szervezetre, kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett hatásait vizsgáltuk.

## 2. Irodalmi áttekintés és célkitűzésünk

### 2.1 Növények, növényi eredetű hatóanyagok vizsgálata többféle aspektusból

A Földön élő emberek alapvető hatással vannak a világ változására, ennek nyomon követése és felderítése kísérletek formájában történik. A növények és természetes eredetű növényi hatóanyagok széles tudományos körben szolgálnak témául, számos különféle kutatási szakterületen dolgozók számára. Több aspektusból is vizsgálunk egy-egy növényt, vegyük például a narancsot. Kutatók a klímaváltozás esetleges hatásait vizsgálták a narancs termelésre, ennek eredményeként leírták, hogy a klímaváltozás okozta napi középhőmérsékletek emelkedésének ellenére az esetlegesen előforduló fagykár a citrus gyümölcsökben nem csökkent fordított arányban és azonos mértékben a hőmérséklet emelkedésével [5]. Egy másik kutatócsoport a klímaváltozás szimulálására emelt hőmérsékleten termesztett eprek húsában antioxidáns kapacitás emelkedést figyelt meg [6], míg mások csökkent vitamin szinteket mértek hasonló körülmények között számos gyümölcsben és zöldségben köztük narancsban is [7].

Az emberiség okozta klímaváltozás globális következményeinek ezek csak apró bizonyítékai. Táplálkozásunk szempontjából azonban igen fontos ismeretek ezek, ugyanis számolnunk kell azzal, hogy esetlegesen a gyümölcsök és zöldségek melyekből táplálékunk szerves része áll, minőségbeli változáson mentek keresztül a környezet változásának hatására. Ezért lényeges, a táplálékunkkal be nem vitt és a szervezet működése szempontjából fontos vagy nélkülözhetetlen hatóanyagok, vitaminok, nyomelemek pótlása. A narancs, a citrom és az alma az egyik leggyakrabban fogyasztott gyümölcsök korunkban, hiszen magas C-vitamin tartalmuk mellett megtalálható bennük egyéb sokféle szerkezetű vegyület is, mely a szervezet számára hasznos.

A narancsot (*Citrus sinensis*) például C-vitamin pótlásán kívül számos betegség kezelésére is használják tradicionálisan; így székrekedés, kólika, hasmenés, bronchitis, tuberkulózis, köhögés, megfázás, elhízás, menstruációs görcsök, angina, magas vérnyomás, szorongás, depresszió és stressz kezelésére [8]. A *Citrus sinensis* tartalmaz például flavonoidokat [9-13], szteroidokat, hidroxilamidokat, alkánokat és zsírsavakat [14], kumarinokat [15-17], peptideket [18, 19], szénhidrátokat [20, 21], karotinoidekat [22-24], illékony komponenseket [25, 26] és ásványi anyagokat, mint például kálium, magnézium,

kalcium, nátrium [27]. Ezen alkotóelemeket számos kutatócsoport vizsgálta, azonosította a *Citrus sinensis* különböző részeiből, például gyökeréből, leveléből, virágából, gyümölcséből. Az azonosított komponensek alátámasztják a gyümölcs tradicionális gyógyászatbeli használatát.

A *Citrus sinensis*-ben lévő hatóanyagok sokféleségének köszönhetően a kutatott farmakológiai hatásai is igen szerteágazóak. Rendelkezik antibakteriális [28], antifungális [29], antiparazita [30], antiproliferatív [31], antioxidáns hatással [8], ezen túlmenően hypokoleszterolémiás [32], obezitás-ellenes [33], kardiovaszkuláris [22] aktivitással is bír. A legtöbbet vizsgált farmakológiai hatás, a rendkívül jó antioxidáns kapacitásának köszönhető, mely az alapja egyben a kardiovaszkuláris rendszerre gyakorolt pozitív hatásnak is. Antioxidáns aktivitását különféle mesterséges gyökökkel szemben is vizsgálták, például DPPH, ABTS, ismert antioxidáns standardokhoz viszonyítva, mint a Trolox, C-vitamin, gallusz sav [26, 27, 34], valamint antioxidáns esszékkel, beleértve a FRAP és ORAC esszét [22, 35].

Ezen túlmenően a citrusfélék feldolgozása és a gyümölcslé tárolása során végbemenő változások szintén fontosak, ugyanis nagymértékben lé formájában jutnak a szervezetbe. Wibowo és társai vizsgálták, a narancslében lévő totál karotinoid mennyiségének változását a tárolás hőmérsékletétől és időtartamától függően. Eredményeik alapján elmondható, hogy nem kedvez sem a 42 °C-on, sem a hűtőben való tárolás; a 20 és 28 °C-on történt tárolás pedig nem befolyásolja szignifikáns mértékben a karotinoid tartalmat. Megjegyzendő továbbá, hogy kísérleteikben nem minden karotinoid mennyisége változott azonos mértékben és irányban a tárolási hőmérséklet változtatása során, például a  $\zeta$ -karotin mennyisége a hőmérséklet emelésével kis mértékben nőtt, míg az  $\alpha$ - és  $\beta$ -karotin mennyisége csökkent [23].

## **2.2 Oxidatív stressz és szabadgyökök a szervezetben**

A szervezetben létrejövő oxidatív stressz a szabadgyökök és oxidáló ágensek mennyisége és a védekező mechanizmusok közti egyensúly felborulása következtében alakul ki. Ennek számos befolyásoló tényezője van, mint például a kor, genetikai sokszínűség, környezet, életmód, krónikus betegségek és stressz. A szabadgyökök felszaporodása fiziológiásan az öregedés folyamatában is megfigyelhető, ahol a szervezet kompenzáló mechanizmusainak kimerülését követően kis mértékű oxidatív stressz jön létre [36, 37], melynek eredményeképpen alakulnak ki többek között a ráncok és az öregségre jellemző

pigment foltok. Számos betegség háttérében tapasztaltak emelkedett szabadgyök szinteket, például diabetes [38], reumatoid arthritis [39], Alzheimer-kór [40] és egyéb neurodegeneratív betegségek, krónikus veseelégtelenség [41], kardiovaszkuláris kórképek [42] esetében. Arról azonban megoszlanak a szakmai vélemények, hogy az emelkedett szabadgyök szintek miatt alakul-e ki az adott betegség, vagy fordítva.

A szabadgyökök termelődésének fő helye a mitokondrium belső membránjában található légzési lánc fehérjéi, melyek a terminális oxidáció folyamatában játszanak szerepet. A lánc fiziológiás működése során keletkeznek különféle szabadgyökök és oxidáló ágensek; szuperoxid anion ( $\text{O}_2^-$ ), hidroxil gyök ( $\text{OH}^\cdot$ ), valamint hidrogén-peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), melyeknek körülbelül 2 %-a „megszökik” a rendszerből. A szervezetben lévő védekező mechanizmusok eredményeképpen a keletkezett szabadgyökök semlegesítése megtörténik. A szuperoxid anion szuperoxid-dizmutáz segítségével hidrogén-peroxiddá alakul, a hidrogén-peroxid pedig kataláz vagy glutation-peroxidáz enzim működésének eredményeképpen vízzé. Amennyiben a szabadgyököket nem képes a szervezet, vagy túlzott termelődésük, vagy az antioxidáns rendszer alulműködése vagy nem kielégítő működése miatt semlegesíteni; abban az esetben fehérjéket, DNS-t, lipideket károsíthatnak [43].

A szabadgyökök működésének következtében oxidatív sérülések keletkezhetnek [37], a fehérjék karbonilálódnak és funkcióvesztés is előfordulhat. A folyamat során a fehérjében a karbonil kötések száma fokozódik, melynek következtében stabilabb konformáció jön létre, és funkciójuk módosulhat. Ez akár a sejtek pusztulásához is vezethet [44], ha egy a sejt számára fontos fehérjét érint a változás [45].

### **2.3 Antioxidánsok, antioxidáns tartalmú növények a kutatások középpontjában**

Az antioxidánsoknak két fő típusa van; az endogén és az exogén antioxidánsok [46]. Az endogén antioxidánsok szervezetünkben termelődnek; lehetnek enzimek, koenzimek és hormonok, mint például a melatonin [47]. Az enzimatis részhez tartozik a DNS-be kódolt antioxidáns enzimrendszer, mely olyan enzimeket foglal magába, mint a kataláz (CAT), a glutation-peroxidáz (GPX), vagy a szuperoxid-dizmutáz (SOD). A melatoninnak kettős szerepe van a szabadgyökök semlegesítésében, ugyanis azon kívül, hogy maga is jó gyökfogó [48, 49], számos antioxidáns enzimet is aktivál; GPX, SOD és CAT [50, 51], valamint stimulálja a génexpressziójukat. Melatonin adagolás hatására egy kísérletben különféle SOD izoformák mRNS szintjének szignifikáns emelkedését figyelték meg [52]. Más kísérletekben

patkányoknak adagoltak egy nagy vagy több kisebb dózisban melatonin injekciót, melynek eredményeképpen szintén SOD gén expresszió növekedést tapasztaltak [53].

Az exogén antioxidánsokat nem a szervezet termeli. Ebbe a körbe számos különböző szerkezetű vegyület tartozik; a C-vitamin (aszkorbinsav), E-vitamin ( tokoferol), A-vitamin és előanyagai (retinol, karotinoidek, likopin), flavonoidok, rezveratrol, omega-zsírsavak, szelén, és galluszsav. [46].

Az exogén antioxidánsok bevitele történhet a táplálékunk részét képező zöldségek, fűszerek, gyümölcsök fogyasztásával, vagy akár táplálékkiegészítők szedésével is. Magas antioxidáns tartalmú növények közé tartozik például a szőlő, narancs, málna, áfonya, acai bogyó, mangosztán, meggy, barack, szegfűszeg, fahéj, gránátalma, avokádó, kakaó, kivi, zöld tea, kurkuma, spenót, brokkoli, paradicsom, petrezselyem, fokhagyma, dió, mogyoró, pisztácia és mandula. Ezen felsorolásból látszik, hogy az étrendben gyakran előfordulnak antioxidánsok, illetve ezen alapanyagok tudatos használatával igen sokszínű és egészséges táplálkozást valósíthatunk meg.

A táplálékaink előkészítése, a sütés-főzés során használt fűszernövények közül magas antioxidáns aktivitással rendelkező, a magyar konyha által az egyik leggyakrabban használt petrezselyem és fokhagyma. A petrezselyemben megtalálhatók karotinoidek, C-vitamin, polifenolos vegyületek és katechinek [54, 55],[56]. A varsói egyetem kutatói petrezselyemből történő polifenolos komponensek kivonását optimalizálták, eredményeik szerint acetonnal és metanollal szemben a desztillált víz tűnt a legjobb extrakciós oldószernek; ezen állításukat az ABTS gyök és vas-kelát kapacitási eredményekre alapozták [56]. A fokhagyma mind nyersen mind hőkezelést követően egyaránt használt alapanyag; számos tanulmány foglalkozott a benne lévő hatóanyagok, valamint a növény gyógyhatásának vizsgálatával. Ennek során derült fény antibakteriális [57], antimikotikus [58], arterioszklerózist-, véralvadást gátló [59] és vérnyomáscsökkentő hatására [60]. Shin és munkatársai [61] a fokhagyma gyulladáscsökkentő hatásának változását vizsgálták, hő hatására, imitálva ezzel a főzés során végbemenő folyamatokat. Tapasztalatuk alapján hőkezelés következtében csökken a gyulladáscsökkentő hatás, amiért valószínűleg az allicin nevű hatóanyag felelős. Más kutatócsoport pedig szignifikáns mértékben csökkent véralvadást gátló hatást tapasztalt hőkezelés hatására fokhagyma kivonatokon [62].

A továbbiakban a teljesség igénye nélkül szeretném a fent felsorolt gyümölcsök antioxidáns tulajdonságát tudományos kutatási eredményekkel alátámasztani (3. táblázat).

### 3. táblázat: Antioxidáns tartalmú növények és azok főbb aktív komponensei

	<b>Fő antioxidáns komponensek</b>	<b>Hivatkozások</b>
<b>Szegfűszeg</b>	fenolos komponensek: eugenol, gallusz sav	[63, 64]
<b>Fahéj</b>	fenolos komponensek, fahéjaldehid, metoxifahéjaldehid	[63, 65]
<b>Gránátalma</b>	fenolos komponens: gallusz sav	[66]
<b>Avokádó</b>	karotinoidok	[67]
<b>Kakaó</b>	fenolos komponensek: katechin, epikatechin	[68]
<b>Kivi</b>	c-vitamin, karotinoidok	[69]
<b>Kurkuma</b>	kurkumin, ferula sav	[70, 71]
<b>Brokkoli</b>	karotinoidok, fenolos komponensek	[72]
<b>Paradicsom</b>	likopén, karotinoidok	[73]

Patki és munkatársai [74] szőlőporral kezelt fiatal és öreg patkányok szorongás-szerű viselkedését és ehhez kapcsolódóan a plazma antioxidáns kapacitását vizsgálták, valamint kortikoszteron szintet és oxidatív stressz indexeket mértek. Tapasztalataik alapján a szőlő protektívnek bizonyult a korfüggő szorongás ellen és a szőlővel nem kezelt állatokban a kor előrehaladtával emelkedett kortikoszteron szintet mértek, míg a szőlőporos kezelés következtében ez az emelkedés elmaradt. Továbbá a szőlő kezelés megelőzte a kor indukálta oxidatív stressz szintjének emelkedését is. Lin és munkatársai [75] kutatásai alapján a szőlő szuszpenzió *in vivo* iszkémia-reperfundált nyúl húgyhólyagon protektív hatásának bizonyult. Kutatócsoportunk vörös szőlőmag extraktum patkányokon végzett kezelésének eredményeképpen kardiovaszkuláris protekciót tapasztalt iszkémia/reperfúzió indukálta károsodásokkal szemben, ami megnyilvánult szignifikánsan jobb posztisztkémiás szívfunkciós eredményekben, melynek oka a csökkent mértékű oxigén szabadgyök képződése lehet [76].

Számos kutatócsoport vizsgálta és vizsgálja a narancsot, mint magas antioxidáns tartalmú gyümölcsöt [8]. A dél-itáliai Barreca és munkatársai a vérnarancs flavon tartalmát mérték, valamint a gyümölcslé antioxidáns tulajdonságát. Kísérleteik során a flavonoidok szeparálását és azonosítását LC-MS-MS technika segítségével végezték, kilenc vegyületet sikerült azonosítaniuk. Ezt követően TEAC, FRAP és hidroxil-gyök fogási assay-eket végeztek. Összességében elmondható, hogy a flavonoid tartalmú frakciók egyértelműen hozzájárulnak a gyümölcs antioxidáns kapacitásához, de nem önmagukban felelősek azért [34]. Atrooz különböző növényi magok extraktumainak, többek között a narancs magjának antioxidáns aktivitását és polifenol tartalmát vizsgálta. Eredményei szerint a metanolos extraktumok magas antioxidáns aktivitást mutattak, valamint magas flavonoid tartalmat [77].

A málna (*Rubus idaeus*) igen gazdag forrása az étrendi antioxidánsoknak; mint például a fenolos savaknak, flavonoidoknak és antocianinoknak [78, 79] ezek mellett C vitamint, élelmi rostokat,  $\alpha$ -tokoferolt, tokotrienolt, kalciumot, káliumot, magnéziumot, karotinoidokat és linolénsavat is tartalmaz [80, 81]. A málnának mind a levelében mind a termésében található az antioxidáns kapacitásáért felelős hatóanyagok. Denev és munkatársai [82] a málnalevél acetonos-hangyasavas extraktumán végeztek antimikrobiális és antioxidáns aktivitást méréseket, melynek eredményeképpen kiemelendő antimikrobiális aktivitást mértek 11 féle vizsgált humán patogénnel szemben, valamint mérsékelt antioxidáns aktivitást tapasztaltak ORAC esszével. Szerb kutatók két különböző fajta málna liofilizált, majd metanolban visszaoldott kivonatát vizsgálták, totál fenol, flavonoid és antocianin tartalomra. Kísérleteikben a málna extraktumok jó DPPH gyökfogónak bizonyultak, és jelentős mennyiségben tartalmaztak fenolos antioxidánsokat [78].

Az áfonya szintén nagyon magas antocián tartalommal rendelkezik [83], az eltérő földrajzi területekről származó gyümölcsök és ezen kívül más-más oldószer használata a hatóanyagok vizsgálatához szükséges extrakcióhoz, valamint az extrakció módszere, szignifikáns mértékű különbségeket eredményezett a totál antocianin koncentrációban [84]. Természetesen az áfonyában sem egyféle vegyületcsoportba tartozó antioxidáns tulajdonságú vegyület található, hanem előfordulnak más polifenolos vegyületek is; mint például flavonoidok, procianidinek, flavonolok, mint például kempferol, kvercetin, miricetin, ezen kívül fenolos savakat, valamint stilbén származékok [85].

Az egyre szélesebb körben ismertté váló rendkívül magas antioxidáns kapacitású gyümölcs az acai bogyó [86] és a mangosztán [87]. Az acai bogyó bizonyítottan rendkívül magas ORAC értékéért, a gyümölcsben lévő gazdag antocianin tartalom a felelős [88]. A főként Dél-Kelet Ázsiában termesztett trópusi gyümölcs, a mangosztán [89] méltán egyre nagyobb figyelmet kap; hiszen számos friss tanulmány bizonyította az élő szervezetre gyakorolt pozitív hatásait. Egészséges felnőttekben, randomizált, kettős vak, placebo kontrollos vizsgálatokban a gyümölcs levének fogyasztása következtében 30 nap elteltével *in vivo* antioxidáns és gyulladásgátló biomarkerek szintjének emelkedését figyelték meg [87]. Egy másik tanulmányban önkénteseken végzett kísérletekben bizonyítást nyert, hogy a mangosztán tartalmú ital fogyasztását követően a vérplazma antioxidáns szintje emelkedett, melyet LC-MS módszerrel vizsgáltak [90]. A tapasztalt hatásokért többek között a mangosztánban lévő fenolos vegyületek (epikatechin) [91], valamint xantonok [92] lehetnek a felelősek. Tapasztalati alapon azonban az ázsiai orvoslás már évszázadok óta használja különböző betegségek gyógyítására ezt a gyümölcsöt [89].

### 2.3.1 Csonthéjas növényi mag-drogok

A csonthéjas növények közé számos Magyarországon fellelhető faj tartozik. Ezen növények közös jellemzője, hogy a magházból kifejlődő termés belső része (*endocarpium*) megvastagodott, ez az ún. „csonthéj”. Ezt fedi kívülről a termés középső része (*mezocarpium*) mely általában húsos és legkívül található a bőrnemű *exocarpium*. A csoportba tartozó növények nagy részét gyümölcsként fogyasztjuk, például cseresznye, datolya, szilva, málna vagy olajos magvukat hasznosítjuk, például olajbogyó, mandula, dió.

Bár nem a legmagasabb antioxidáns tartalommal bíró, de annál gyakrabban fogyasztott csonthéjas gyümölcsök hazánkban a sárgabarack és a meggy, éghajlati adottságainkból adódóan. A sárgabarack (*Prunus armeniaca*) gyümölcshúsa számos fenolos vegyületet tartalmaz [93], míg magja értékes olajat. A barackmagolaj összetételét vizsgálva elmondható, hogy a vegyületek között azonosítottak többek között szterolokat, szkvalént, benzaldehidet, számos telítetlen zsírsavat [94] [95, 96], ezen kívül cianoglükozidokat is, melyek toxikusak a szervezetre [97]. A mag cianoglükozid tartalma miatt fogyasztása és felhasználása korlátozott; más csonthéjas csümölcsök magjában is megtalálható ez a vegyület, mint például a meggy vagy a mandula [98].

A meggyet (*Prunus cerasus*) évtizedek óta számos kutató vizsgálta, eredményeik alapján elmondható, hogy a gyümölcs húsa gazdag katechinben és C-vitaminban, valamint fenolos komponensekben (fő komponense a flaván-3-ol) [99] [100]. Kutatócsoportunk a meggy feldolgozása során melléktermékként keletkező csonthéjas mag vizsgálatával foglalkozott; a hulladék esetleges későbbi hasznosítása céljából, melyben azonosítottunk több biológiailag aktív vegyületet [101].

A meggy mag vizsgálata során kutatócsoportunk egy hexános extrakciós mintaelőkészítési eljárást követően külön vizsgálta a meggy mag szilárd és külön az olajos frakcióját. A szilárd frakció nagy mennyiségben tartalmaz polifenolokat és flavonoidokat (4. táblázat) [101]. A flavonoidoknak, mint gyulladásgátló és antioxidáns vegyületeknek, fontos szerepük van az iszkémia/reperfúzió okozta károsodások mérséklésében. Enzimeket képesek gátolni, csökkentik a ROS mennyiségét, javítják az elektron transzfert, és növelik a szubsztrát kötő aktivitásukat.

**4. táblázat:** A meggy magbél szilárd frakciójának azonosított komponensei

Név
dihidro-p-kumarinsav
kávésav
cianidin
peonidin
procianidin
pinocembrin
tangeretin
kvercetin-3-glükózid
klorogénsavval acetilezett kvercetin-3-glükózid
galluszsavval acetilezett procianidin trimer
epikatekin-3-gallát dimer
kumarinsavval acetilezett katekin-3-glükózid
kumarinsavval acetilezett galangin

Kísérleteinkben igazoltuk, hogy a meggy magbél szilárd kivonatával kezelt patkányok esetében iszkémia/reperfúzió során nőtt a koronária átáramlás, az aorta kiáramlás a kontroll állatokhoz képest, valamint csökkent a szívizomsejt apoptózis, a szív infarktusz területének mérete, a kamrai aritmiák előfordulási gyakorisága, és a kaszpáz-3 enzim aktivitása [102]. Patkányokon végzett kísérleteink során a flavonoidokban gazdag meggy magbél kivonat adása 10-30 mg/kg mennyiségben csökkentette az iszkémia/reperfúzió okozta szem károsodásokat. A meggy magbél kivonattal kezelt állatoknál a reperfúziót követő 24 órában az intracelluláris  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  felhalmozódás mérséklődött és a hatóanyag meggátolta a  $\text{K}^+$  veszteséget a szemben [103].

A bioflavonoidok HO-1 aktiváló hatása során a hem lebomlik, így nem halmozódik fel az erekben. A folyamat során szénmonoxid és bilirubin is keletkezik, melyek védnek az oxidatív stressz ellen. A HO-1 befolyásolja a homeosztázist például iszkémia és ventrikuláris fibrilláció során is. Aktivitásának növelése elősegíti a sejtek védekezését, az indukálódó endogén védekező mechanizmusok által, amelyek szelektíven végzik a homeosztázis helyreállítását [104]. Kutatócsoportunk további patkányokon végzett kísérletei során a meggy magbél szilárd frakciójával történő előkezelést követően iszkémia/reperfúzió okozta károsodással szembeni kardioprotekciót tapasztalt, ami nyilvánult többek között a posztisztkémiás szívparaméterek javulásában, valamint emelkedett HO-1 szintben [105].

A szilárd fázis kis mennyiségű transz-rezveratrolt is tartalmaz, melynek antioxidáns, antitrombotikus és gyulladásgátló hatása van. Rezveratrollal végzett kezelés cukorbeteg patkányok esetében csökkentette az állatok testsúlyát, vércukorszintjét, iszkémia/reperfúziót követően mérsékelte a szívek infarktusz területének méretét, csökkentette az endothelin-1 expresszióját és a szív sejteinek apoptózisát, valamint fokozta a GLUT-4 expresszióját [106].

Az olajos frakció a mag ~35%-a, főbb komponensei az 5. táblázatban láthatók, melyek a frakció körülbelül 98%-át teszi ki.

**5. táblázat:** A meggy-magbél olajos frakciójának azonosított komponensei

Név	Komponens %-a
E-vitamin	<1
9,12-oktadekánsav-metilészter	<1
oleamid	<1
szkvalén	1-1.2
$\beta$ -tokoferol	1-1.6
palmitinsav	3-4
1-monooleát	3-4
$\gamma$ -szitoszterol	4-5
linolsav	35-38
olajsav	50-53

A legnagyobb mennyiségben telítetlen zsírsavakat, olajsavat (50-53%) és linolsavat (35-38%) tartalmaz. Ismert, hogy a növényi olajok képesek csökkenteni a vérplazma koleszterin szintjét. Amerikai kutatók által végzett kísérletek során az olajsav és a linolsav hatását összehasonlítva, mindkét telítetlen zsírsav esetén megfigyelhető volt az összkoleszterin és az LDL-szint csökkenése, közel azonos mértékben, viszont a linolsav nagy mennyiségben adva csökkentette a HDL-szintjét is [107]. A linolsav az omega-6 zsírsavak közé tartozik. Fontos alkotója a növényi és állati sejtmembránoknak, és a megfelelően kialakított omega-3: omega-6 arány képes csökkenteni a koszorúér betegségek kialakulásának kockázatát [108].

Az olajos frakcióban 4-5 %-ban található szitoszterol a növényi szterolok közül csökkenteni képes a plazma LDL és az összkoleszterin szintjét. A növényi szterolok a koleszterinnel megegyezően adozin kötő transzporterrel keresztül jutnak ki a bél lumenből, a szitoszterol kötődése a transzporterhez csökkenti a plazma koleszterin szintjét, emiatt már kis mennyiségben is hatásos lehet [109].

A tokoferol (E-vitamin), a meggy mag olajos frakciójának egyik minor komponense. Funkcióit tekintve az egyik fő antioxidáns a sejtmembránban, védi a többszörösen telített zsírsavakat az oxidációtól. Képes semlegesíteni a ROS különböző formáit, és így csökkenteni az oxidatív stressz mértékét [104]. Igazoltan véd a lipid peroxidáció ellen is. Képes módosítani a protein kináz C aktivitását, csökkenteni a trombocita aggregációt, gátolni az immunrendszer interakcióját az érrendszerrel, ezáltal megelőzni az adhéziós molekulák expresszióját a vaszkuláris endotheliális sejtek felszínén [110].

A meggy magból általunk azonosított olajos frakciójának egyes komponensei számos más kutatócsoport témájául is szolgáltak, melynek során többféle jótékony hatást bizonyítottak élő vagy élőből származó kísérleti modelleken. Több tanulmány bizonyította a többszörösen telítetlen zsírsavak szív- és érrendszerre kifejtett védőhatását [111, 112]. A vegyületek forrásaként leginkább tengeri halak ismertek, mint például a makréla, szardínia, hering, lazac. Ezen beviteli forrással kapcsolatban két problémát kell feltétlenül megemlíteni, a tengerek szennyeződésének következtében létrejött nehézfém kontaminációt és a modern halászati módszerek miatti túlhalászást. Más forrásból származóan többszörösen telítetlen zsírsavak találhatóak egyes magolajokban. A csonthéjasokból származó olajok felhasználási lehetőségei között említhetjük, a szív- és érrendszert támogató [113], valamint fotoprotektív makrotápanyagokként történő alkalmazásukat [114].

Eddigi kísérleteink eredményei alapján, melynek során azonosítottuk a főbb komponenseket és pozitív kardiovaszkuláris hatásokat tapasztaltunk, a meggy magból frakciók további vizsgálatát tűztük ki célul, melynek keretében állatokon végeztünk toxikológiai vizsgálatokat, az eredmények tükrében pedig humán kipróbálása is megtörtént az OÉTI ajánlása alapján [115].

### **2.3.2 Karotinoidok, a béta-karotin**

A karotinoidok szervezeten belüli viselkedését befolyásolja szerkezetük, a bevétel módja, az alkalmazott dózis. A karotinoidok jelentős élettani szerepét adja a konjugált szerkezetük. Fotoszintetizáló szervezetekben a karotinoidok a fényt képesek "felvenni" és a fényenergiát átadni a fotoszintézisben résztvevő festék tartalmú sejteknek. Nem fotoszintetizáló szervezetekben fényvédő szerepük van, amiért cisz-transz izomériájuk a felelős [116]. A karotinoidok antioxidáns és szabadgyökfogó tulajdonságuk mellett képesek az immunrendszer modulálására és a gap junction kommunikáció befolyásolására is [117].

Szerkezetüknek köszönhetően számos izomer formájuk létezik. A természetben főként all-transz formában fordulnak elő. A különböző izomer formák tulajdonságai eltérőek lehetnek, pl. más az oldékonyságuk és a felszívódásuk. A transz izomerek rigidebbek és hajlamosabbak kikristályosodni vagy aggregálódni, mint a cisz izomerek. Ezért a cisz izomerek könnyebben felszívódhatnak és transzportálódhatnak. Az egyes izoformák a tárolás és feldolgozás során átalakulhatnak egymásba, pl. hő hatására az all-transz izomerekből különféle cisz izomerek képződhetnek [118].

Az emberi szervezetben a karotinoidok felszívódása nem azonos mértékű a gyümölcsökből és a zöldségekből. Ennek oka, hogy a zöldségekben a karotinoidok a chloroplastban, a gyümölcsök esetében a chromoplastban található. A chloroplast ellenállóbb az emésztőnedvekkel szemben, így ebből nehezebben szabadul fel a karotinoid, tehát a gyümölcsökből történő felszívódás eredményesebb [118]. Egy kutatócsoport megvizsgálta és bizonyította, hogy a zöldségekből való felszívódás javítható a karotinoid tartalmú étellel egy időben történő nagy mennyiségű lipid bevitellel. A kutatás során megvizsgálták a paradicsomszószból és a nyers sárgarépból történő karotinoid felszívódást úgy, hogy az egyik esetben magas lipid tartalmú avokádót szolgáltak fel az étel mellé, a másik esetben viszont nem. A felszívódás az első esetben eredményesebb volt [119].

A  $\beta$ -karotin a karotinoidok közül az egyik legtöbbet kutatott vegyület, szerkezetének köszönhetően a leglipofilebb karotinoidok közé tartozik. Az epidemiológiai vizsgálatok többsége azt mutatja, hogy a  $\beta$ -karotinban gazdag ételek fogyasztása a tüdőrák és egyéb daganatos betegségek kisebb előfordulásával van összefüggésben nemdohányzók esetében [120]. Továbbá a  $\beta$ -karotin magas plazmaszintjét összefüggésbe hozták kardiovaszkuláris megbetegedések csökkent rizikójával is [121]. Bár a béta-karotin antioxidáns tulajdonságát már korábban leírták, egyre több bizonyíték utal arra, hogy bizonyos körülmények között prooxidánsként viselkedhet. Ezzel összhangban van az a megállapítás, hogy a béta-karotin hatásait vizsgáló nagy klinikai tanulmányok során nem volt bizonyítható protektív hatása a vegyületnek [122]. Megjegyzendő továbbá, hogy olyan populációk esetében, ahol fokozott oxidatív stressz áll fenn; például dohányzás, a béta-karotin kezelés, különösen nagy dózisban alkalmazva növelte a mortalitást olyan egyének esetén, akiknél fokozott volt a tüdőrák kialakulásának veszélye [120]. Ezt a megfigyelést azzal hozzák kapcsolatba, hogy a béta-karotinból fokozott oxidatív körülmények között különböző reaktív és toxikus bomlástermékek keletkezhetnek, melyek többek között mitokondriális diszfunkciót és DNS károsodást okozhatnak [123-127].

Rágcsálók egészséges és tumoros thymocytá sejtjein végzett kísérletek azt mutatták, hogy magas parciális oxigén nyomás mellett a  $\beta$ -karotin elveszíti antioxidáns hatását és ez a tumoros sejteknél még kifejezettebb, azonban maga a mechanizmus még tisztázatlan [118]. A nagy parciális oxigén nyomáson kívül még a  $\beta$ -karotin magas dózisu alkalmazása is kiválthat prooxidáns, ezáltal prokarcinogén hatást. Sejtkultúrákon végzett kísérlet során kimutatták, hogy a  $\beta$ -karotin magas dózisu alkalmazása fokozott mértékű ROS termelődést eredményezett. A ROS kimutatható volt az egész citoplazmában és a mitokondriumban egyaránt [127].

Egy 2001-ben publikált tanulmány, egy lehetséges magyarázatot fogalmaz meg a megnövekedett ROS produkció és a megemelt  $\beta$ -karotin bevitel között. Sprague-Dawley patkányokat kezeltek *per os* bejuttatott  $\beta$ -karotinnal, egyszeri vagy ismételt dózisban. Az öt napos kezelés után megvizsgálták az állatok tüdejét, máját, veséjét és a beleket, mindegyik esetben emelkedett ROS szintet mutattak ki. Ennek okaként azt állapították meg, hogy a  $\beta$ -karotin különböző CYP enzimeket indukál, aminek következménye lehet a nagyobb mennyiségű ROS termelés [128].

Kutatócsoportunk az elmúlt másfél évtizedben különböző növényi eredetű anyagok kardiovaszkuláris és biológiai hatásait is vizsgálta [76, 101-103, 129-131]. Ennek részeként kutatásunk további részében a béta-karotinnal foglalkoztunk. Ezekre alapozva célunk volt az alacsony és magas dózisu béta-karotin kezelése kardiovaszkuláris hatásainak vizsgálata szívizomban, iszkémia/reperfúzió okozta fokozott oxidatív körülmények esetén.

## **2.4 Növényi eredetű hatóanyagok és az oxidatív stressz**

Az oxidatív stressz során a szervezetben nagy mennyiségben termelődő szabadgyökök elleni védekezés fegyverei lehetnek az antioxidáns tulajdonságú növényi eredetű hatóanyagok. Számos kutatás vizsgálta antioxidánsok különböző betegségek hátterében lévő oxidatív stresszre gyakorolt hatásait.

Kutatások szerint a gránátalma kezelés többféle kísérletes modellben is májvédő hatásának bizonyult például malária- [132] és arzén-indukálta [133] károsodással szemben a szöveti oxidatív stressz csökkentésén keresztül. Más kísérletekben a gránátalma flavonoid gazdag frakcióját sztreptozocin indukálta cukorbetegségben védő hatásának találták a korai diabéteszes nefropátia kialakulásával szemben, patkány modellben [134].

Meggy-magbél kivonattal végzett kísérletek során reumatoid arthritisz betegekben gyulladáskeltő biomarkerek szintjének csökkenését, valamint HO-1 enzim expressziójának növekedését figyelték meg [135]. Egereken végzett kísérletekben kimutatták, hogy a meggy

kivonattal történő előkezelés termékenység növelő, ami a kivonatban található antocianinok erős antioxidáns hatásának tulajdonítható, melynek következtében HAS2 és PGR génexpresszió fokozódása volt megfigyelhető [136]. Továbbá kutatócsoportunk patkány iszkémia/reperfúziós modellben a meggymagból kivonat kezelést kardioprotektív hatásúnak találta [102].

Béta-karotinnal végzett kísérletek sora bizonyította a hatóanyag oxidatív stressz elleni hatékonyságát. Hím albinó patkányokban hipoxia indukálta oxidatív stressz esetén, a plazmában és a szövetekben csökkent malondialdehid szintet detektáltak béta-karotin kezelést követően, mely ezáltal protektívnek bizonyult [137].

## **2.5 Anti- és prooxidánsok**

Egyre több antioxidáns tartalmú növényi hatóanyagról derül ki, hogy prooxidánsként is viselkedhet. Egyes esetekben a dózis növelése következtében jön létre a cseppet sem kedvező prooxidáns tulajdonság, más esetekben megváltozott pH okozza az antioxidáns tulajdonság háttérbe kerülését. Természetesen egyéb körülmények is befolyásolhatják, hogy egy egyébként antioxidáns tulajdonságú anyag prooxidánsként kezd el működni, mint például genetikai alapon egyes enzimek felszaporodása, vagy gyógyszereszedés esetén nem kívánt interakciók. Maguk az antioxidánsok nem csak antioxidánsként működnek a szervezetben, befolyásolnak jelátviteli utakat és génexpressziót is, emiatt is megfontolandó alkalmazásuk gyakorisága és a mértéke [138].

## 2.6 Célkitűzésünk

Munkánk során célul tűztük ki a meggy-magbél kivonat és a béta-karotin, mint természetes eredetű anyagok élő szervezetre gyakorolt hatásainak vizsgálatát.

- I Kísérleteink első részében egér modellen meggy-magbél kivonattal történő 8 napos kezelések hatását vizsgáltuk a máj- és vese működést jelző vér biomarkerek szintjére, illetve a morfológiai változásaira. Ezen természetes anyaggal végzett kutatások részeként tengerimalac leborotvált csupasz bőrén vizsgáltuk a magolaj toxicitását, valamint különféle koncentrációban meggy-mag olajat tartalmazó krém által kifejtett fotoprotekciót.
  
- II Kísérleteink második részében egy másik természetes eredetű hatóanyag, a béta-karotin hatásait vizsgáltuk. A patkányok hosszú idejű alacsony és magas dózisú kezelését követően az állatokat extermináltuk, majd izolált dolgozó szív preparátumon vizsgáltuk iszkémia/reperfúzió során a szívparamétereket, majd ezen protokollt követően meghatároztuk a szívek infarktuszos területeit, HO-1 enzim szintjét, totál antioxidáns kapacitását. Ezen kísérletsorozat részeként H9c2, kardiomiocita sejteken vizsgáltuk a béta-karotin esetleges citotoxicitását különböző koncentrációkban, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> okozta oxidatív körülmények között.

### **3. Anyag és módszer**

#### **3.1. Meggymagbél kivonat toxicitásának vizsgálata**

##### **3.1.1. Meggymagbél kivonat preparálása**

A meggymagok szárítását követően a csonthéjat eltávolítottuk, majd a meggymagbelet fiziológiás sóoldattal dörzsmozsárban pisztillus segítségével eldörzsöltük, míg megfelelő nem lett a konzisztenciája az állatokon végzett gyomorszondázáshoz. Ez a kivonat egyaránt tartalmazta a magbél olajos és száraz frakcióját is. A bőrön végzett vizsgálatokhoz a csonthéj nélküli meggymagbél nagy nyomású prézelésével előállított magolajat használtuk.

##### **3.1.2. Kísérleti állatok**

Hím C57BL/6J típusú 32 +/- 4 g átlagtömegű egereket használtunk a toxicitási vizsgálatokhoz. A bőr hatástani vizsgálatokat hím Hartley tengerimalacokon végeztük, melyek 250-350 g-osak voltak. Az állatok általános rágcslótápot és vizet kaptak *ad libitum*. A kísérletek megkezdése előtt az állatok egy hétig akklimatizálódtak 25 +/- 2 °C-on, 55 +/- 5 %-os páratartalomban, 12 órás fény/sötét ciklusban. Jelen tanulmány ideje alatt az összes állat a laboratóriumi állatok tartására vonatkozó alapelvek szerinti humánus ellátásban részesült a "National Society for Medical Research and Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" szerint. A kutatás során használt protokollokat a Debreceni Egyetem etikai ügyeket bíráló bizottsága jóváhagyta.

##### **3.1.3. Kezelési protokoll**

Az egereket random módon 5 csoportba osztottuk, a különféle dózisú meggymagbél kivonattal történő kezeléseket megelőzően, melyet napi egyszeri alkalommal szájon át gyomorszondával kaptak. A kezelést 8 napon keresztül a 0-3000 mg/kg dózistartományban végeztük. A csoportok az alábbiak szerint alakultak; I. csoport, negatív kontroll csoport, melyek csak fiziológiás sóoldatot kaptak (n=7), II. csoport, 250 mg/kg meggymagbél kivonat (n=7), III. csoport, 500 mg/kg meggymagbél kivonat (n=8), IV. csoport, 1000 mg/kg meggymagbél kivonat (n=8), V. csoport, 3000 mg/kg meggymagbél kivonat (n=6).

### **3.1.4. Orális toxicitási vizsgálatok (Részben önálló munka)**

A kezelések után a meggy-magbél kivonat máj- és vesetoxicitását vizsgáltuk az egereken. Ehhez az állatokat nátrium-pentobarbitállal (i.p. 80 mg/kg) elaltattuk, ezt követően a juguláris vénából szérumpreparáláshoz vért vettünk az anesztézia ideje alatt, lemértük az állatok súlyát, majd túlaltattuk őket. Ezt követően kimetszettük a májat és a vesét, jéghideg sóoldatban mostuk, a szervek tömegét lemértük és 10 %-os formalinban fixáltuk. Majd kiszámoltuk a teljes testtömeghez viszonyított relatív tömegüket a szerveknek.

### **3.1.5. Makroszkópikus vizsgálat**

Az összes egeret teljeskörű posztmortem vizsgálatnak vetettük alá. Has-, törzs-, és koponya-üri vizsgálatokat végeztünk abnormalitások felderítésére.

### **3.1.6. Szérum metabolitok és enzim aktivitások meghatározása (Részben önálló munka)**

Az egerekben a vese- és májfunkció romlás feltérképezésére a vér-biomarker vizsgálatokat az Asan Pharmaceutical-től (Szöül, Korea) vásárolt kitek segítségével végeztük el. A mintaelőkészítés során a vérmintákat állni hagytuk 1 órán át, majd 300 x g-n 10 percig centrifugáltuk, hogy a szérumot kinyerjük. Az így előkészített szérum mintákkal a méréseket a kolorimetriás enzimátikus kitek leírásai alapján végeztük el.

A szérum vér-urea-nitrogén (BUN) és kreatinin szintjét monitoroztuk a vese funkció jelzőjeként. A BUN szint mérése az ureáz enzim működésén alapult. A minták abszorbanciáját az előkészítést követően 620 nm-en mértük, és urea standard görbe segítségével határoztuk meg a végső koncentrációkat mg-ban kifejezve. A kreatinin szint meghatározásának alapja a Jaffe reakció, lényege, hogy a kreatinin lúgos közegben pikrinsavval narancs színű terméket képez. Az előkészített minták és a kreatinin sztenderdek abszorbanciáját 495 nm-en mértük az 1. és 7. percben. Ezt követően a standard görbe alapján kiszámoltuk a minták kreatinin koncentrációját mg-ban.

Szérum glutamin oxálacetát transzamináz aktivitást, szérum glutamin piruvát transzamináz aktivitást és szérum alkalikus foszfatázt mértünk a májfunkció monitorozására. A szérum glutamin oxálacetát transzamináz aktivitás mérésének lényege, hogy az enzim működése során az összeállított reakció elegendő glutamát képződött. Ezen terméket színreakció segítségével 450 nm-en detektáltuk abszorbancia méréssel. Végül a koncentrációt kiszámoltuk és NE/l-ben adtuk meg. A májfunkció romlásának vizsgálatára a szérum glutamin piruvát transzamináz aktivitását mérve, reverz transzaminációs reakció során

glutamát és piruvát keletkezett. A kísérlet során a piruvátot detektáltuk színreakció segítségével 570 nm-en mért abszorbanciával. A mért értékek függvényében a koncentrációt kiszámoltuk NE/l-ben. A harmadik májfunkciós enzim mérése az alkalikus foszfatáz enzim működése során a szubsztrátján végzett defoszforiláció következtében keletkező színes termék megjelenésén alapult. A sárga szín abszorbanciáját 405 nm-en mértük, majd kiszámoltuk a koncentrációt NE/l-ben a kapott értékek alapján.

### **3.1.7. Hisztopatológiai/mikroszkópos vizsgálat**

Az egerek máj és vese szöveteit 10 %-os formalinban fixáltuk, parafinba ágyasztuk, majd a blokkokból 5 µm vékony metszeteket készítettünk. Xilolos deparafinizációt követően a szövettani metszeteket tárgylemeze raktuk, és különböző koncentrációjú alkohol oldattal rehidratáltuk (abszolút, 95 %, 85 %, 70 %, 50 %), majd desztillált vízben tartottuk pár percig. Ezt követően timsós-hematoxylin oldatban (Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany) inkubáltuk a metszeteket 4 percig, a sejtmagok specifikus festése érdekében. Folyóvízzel történő öblítés után 0,3 % sósavat tartalmazó alkohollal mostuk a tárgylemezeket 2 percig, differenciálás céljából. Egy újabb folyóvízzel történő öblítés után Scott-féle csapvíz helyettesítő oldat (10 mg nátrium-dihidrogén karbonátot és 100 mg magnézium-szulfátot tartalmazó desztillált víz) következett. Csapvizes öblítést 2 perc eosinnal (Eosin Y oldat, Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany) történő festés követte. Végezetül felszálló alkoholsorral majd xilollal dehidratáltuk a mintáinkat, fedés után pedig fénymikroszkóppal értékeltük eredményeinket.

A vesék medulláris régiójából származó szövet metszeteken vizsgáltuk az ultrastrukturális eltéréseket, amelyek toxikus hatásokat jelezhetnek. A húgyúti csöveket és Malpighi testeket, a véredényeket és a kötőszöveti sejteket kellő részletességgel tanulmányoztuk, hogy feltárjuk az abnormalitásokat.

A máj szövetében olyan szerkezeti jellegzetességeket vizsgáltunk, mint például hepatociták, hepatikus vezetékek, szinuszoidok, és az egész struktúra; az abnormalitások feltárására, melyek toxicitás tünetei lehetnek.

### **3.1.8. Bőr toxicitási vizsgálatok (Részben önálló munka)**

A meggymagbél olaj bőrön kifejtett allergén vagy esetleges károsító hatásának vizsgálata során a tengerimalacokat elaltattuk i.p. adagolt pentobarbitál-nátriummal (30 mg/kg dózisban) a vizsgálatok elvégzéséhez. Az anesztézia ideje alatt az állatok hátán lévő szőrt levágtuk, majd a mikroszőrök eltávolítása érdekében borotváltuk is a bőrfelületet. Az olajat 1, 2, 3, 4, 5 µl mennyiségben a hát területén, öt állat epilált bőrfelületébe masszíroztuk be. A kontrol csoport (n=5) esetén desztillált vizet használtunk a bőrön. Kezdetben az állatokat óránként vizsgáltuk, majd 12 óránként 21 napig.

### **3.1.9. Fényvédelem/fototoxicitási vizsgálatok (Részben önálló munka)**

Vizsgáltuk az olaj bőrre kifejtett UV sugárzás elleni védelmét. Itt öt tengerimalac gondosan borotvált bőrfelületére alumínium fóliát helyeztünk, melyre 5 téglalap alakú rést vágunk. Ezt követően 0-5 tömeg % meggymag olajat tartalmazó karbamidos kenőcsöt alkalmaztunk az egyes réseknél lévő bőrfelületeken, majd a hatás kifejlődésére 30 percet vártunk. Az állatok csupasz bőrét ezután 40 percig UVB fénysugárral világítottuk meg. Hat órával a sugárzást követően vizsgáltuk az UVB sugárzás indukálta bőrkárosodást és a védőhatást, melyet a meggymag olajat tartalmazó készítmény okozott.

### **3.1.10. Statisztikai analízisek**

SPSS statisztikai analízis szoftvert segítségével student t-tesztet használtunk a kapott eredmények elemzésére. Ennek során vizsgáltuk a teszt csoportok és a kontrol állatcsoportok közti különbségek szignifikancia értékeit, a szervek tömegére és az enzim aktivitásokra. Minden összehasonlításnál a  $p < 0,05$  küszöbértéknél tekintettük a változást szignifikánsnak.

## **3.2. Béta-karotin kardiovaszkuláris hatásainak vizsgálata**

### **3.2.1. Kísérleti állatok**

A kísérletekhez felnőtt SD hím patkányokat használtunk (Charles River Laboratories), melyek átlagosan 350-400 gramm tömegűek voltak. Minden állat humánus ellátásban részesült a „Laboratóriumi állatok gondozásának alapelvei” és az „Útmutató a laboratóriumi állatok tartására és felhasználására” betartásával. Jelen tanulmány során az állatok gondozását és kezelését a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága jóváhagyta. Az állatokat áttetsző ketrecekben (3 állat ketrecenként) tartottuk a kísérletek alatt, 12 órás fény/sötét ciklusban; és általános rágcsálótápot és vizet kaptak *ad libitum*.

### **3.2.2. Állatcsoportok és béta-karotin kezelés (Önálló munka)**

A tanulmány során a patkányokat 3 csoportba osztottuk és gyomorszondán keresztül, 4 hétig kezeltük a következők szerint: kontroll csoport hidroxietilcellulóz-víz (1:4) elegye, alacsony dózisu béta-karotin (30 mg/kg/nap) hidroxietilcellulóz-víz (1:4) elegyében szuszpendálva és magas dózisu béta-karotin (150 mg/kg/nap) hidroxietilcellulóz-víz (1:4) elegyében szuszpendálva. Az all-transz béta-karotint a Sigma-Aldrich Kft.-től rendeltük.

### **3.2.3. Iszkémia-reperfúzió és izolált dolgozó szív**

A 4 hetes kezelést követően a patkányokat intraperitoneális ketamin-xylazin (75/10 mg/kg) injekcióval elaltattuk, valamint intraperitoneálisan adott heparinnal (1000 IU/kg) antikoaguláltuk. Torakotómiát követően a szíveket kimetszettük és jéghideg módosított összetételű Krebs-Henseleit bikarbonát pufferbe [118,5 NaCl, 4,7 KCl, 2,5 CaCl<sub>2</sub> × H<sub>2</sub>O, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, és 10,0 glükóz (mM)] helyeztük, majd az aortán keresztül kanuláltuk és „Langendorff”, „nem dolgozó” módban (100 vízcentiméter) 5 percen keresztül perfundáltuk, hogy kimossuk a vért. Ezalatt kanuláltuk a pulmonáris vénát, majd az izolált szív preparátumot átkapcsoltuk „dolgozó” módba (17 vízcentiméter előterheléssel). A dolgozó perfúzió 10 percét követően, 30 perces globál iszkémiát váltottunk ki a pulmonáris beáramlás és az aorta kiáramlás lekötésével. Az iszkémiás periódus végén a ki- és bemenő ágak felengedésével 120 perces reperfúzió következett. A reperfúzió első tíz percét Langendorff perfúzióban végeztük a fatális kamrai aritmiák megelőzése érdekében.

#### **3.2.4. Szívfunkció mérések (Részben önálló munka)**

Az izolált szívek alap funkciók értékeinek mérése a dolgozó perfúzió 10 percét követően történt iszkémia előtt. A bal kamra felépülésének vizsgálatára a paramétereket a reperfúzió 30., 60. és 120. percében mértük. A szívfrekvencia (HR) mérését a számítógép adatgyűjtő rendszerével (AD Instruments, PowerLab 4/25T) végeztük; a koronária átáramlás (CF) értékeit egy adott időtartamig a szívből kicsöpögő folyadék mennyiségének mérésével határoztuk meg; az aorta kiáramlás (AF) mértékét kalibrált áramlásmérővel mértük; a perctérfogatot (CO) az aorta- és a koronária-kiáramlás összegeként határoztuk meg. A verőtérfogatot (SV) a teljes kiáramlás és a szívfrekvencia hányadosaként, valamint a verőtérfogat változást (dSV), a kezelések függvényében, a reperfúziós és az alap verőtérfogat értékeinek hányadosaként, százalékban fejeztük ki.

#### **3.2.5. Infarktusos terület mérése (Részben önálló munka)**

Az infarktusos terület meghatározására TTC festési metodikát használtunk. A 30 perces iszkiémiát és 120 perces reperfúziós periódust követően a szíveket 50 ml 1 v/v %-os foszfát pufferben (pH: 7,4) készült TTC oldattal perfundáltuk, és a mintákat -70 °C-on tároltuk a későbbi analízisig. A fagyasztott mintákat szeleteltük, a szeletek tömegét lemértük és szárítottuk. A száraz szeleteket Epson J323D készülékkel beszkeneltük. Az infarktusos területet (fehér színű) és a veszélyeztetett területet (teljes beszkenelt terület) planimetriás szoftver (ImageJ, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) segítségével határoztuk meg. Az infarktusos terület nagyságát a szeletek tömegével megszoroztuk, és ezeket összegeztük. Az eredményként kapott érték a veszélyeztetett- és az infarktusos területek tömege. Az infarktus mérete, az infarktusos szövet tömegének a veszélyeztetett terület (teljes szív) tömegéhez viszonyítva, százalékban lett kifejezve.

#### **3.2.6. Szív HO-1 szintjének Western blot analízise (Önálló munka)**

A miokardiális szövet HO-1 szintjét Western blot analízissel detektáltuk. Körülbelül 300 mg bal kamrai szövetet jégen izoláló pufferben (25 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, 1 mM orto-vanadát, 10 mM NaF, 10 mM pirofoszfát, 10 mM okadán sav, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF, and 1 × proteáz inhibitor koktél) szövet homogenizátorral (IKA T10 basic ULTRA-TURRAX®) homogenizáltuk és centrifugáltuk (Harrier 18/80R) (2000 rpm, 4 °C, 10 perc). A felülúszókat centrifuga csövekben 10000 rpm-en 4 °C-on 20 percig centrifugáltuk tovább, majd az így kapott felülúszót használtuk, mint citoszolikus frakciót. A fehérje koncentrációt

ND-1000 Nano Drop spektrofotométerrel mértük (BCA Protein Assay Kit Thermo Scientific, Rockford, IL). Harminc mikrogramm fehérjét redukáló 10 %-os poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) szeparáltunk, majd 0,45 µm pórusátmérőjű nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránok 1 órás blokkolását követően, melyet TBST-ben oldott 7 %-os sovány tejjel végeztünk, egy éjszakán át az elsődleges antitestet (GAPDH (Cell Signaling Technology) 1/40000; HO-1 (Sigma-Aldrich) 1/50) tartalmazó 1%-os sovány tejjel TBST-vel inkubáltuk 4 °C-on. Ezt követően a membránokat 3x10 percig mostuk TBST-vel, majd 2 óráig inkubáltuk tormaperoxidáz-enzimmel konjugált másodlagos antitesttel, mely 1 %-os sovány tejjel TBST-ben lett készítve. A membránokat Western blot erősített kemilumineszcens HRP szubsztráttal kezeltük, hogy a jeleket láthatóvá tegyük. Az erősített kemilumineszcens kezelés után a membránokat röntgen filmre (Agfa, Mortsel, Belgium) hívtuk elő. A filmeket ezután digitalizáltuk (Epson J232D szkennert), ImageJ program segítségével analizáltuk, majd a HO-1 jelintenzitást GAPDH-ra normalizáltuk.

### **3.2.7. MTT sejt életképesség vizsgálat béta-karotin citotoxicitásra**

A béta-karotin citotoxicitásának vizsgálatára MTT esszét használtunk. H9c2 sejteket (ATCC, CRL-1446, LGC Standard GmbH, Wesel Germany) vettünk fel és hígítottunk médiumban (Dulbecco's modified eagle's médium Sigma-Aldrich Kft., 10 % FBS és 1 % penicillin-sztreptomycin antibiotikum), majd 96 lyukú plate-re 3000 sejt/lyuk sűrűséggel kiraktuk a sejteket ezt követően 1 napig tenyésztettük. A médiumot Wertz és társai [139] alapján készítettük el, néhány módosítással. A sejteket 4 órán keresztül 0, 2,5, 5, 10 és 20 µM-os béta-karotin oldattal (oldószer THF:abs.EtOH, 1:1) kezeltük. Harminc perccel a béta-karotin után a sejteket 125 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -al kezeltük. Négy órás inkubációt követően 20 µl MTT oldatot (5 mg/ml PBS-ben oldva) adtunk minden lyukhoz és 3 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk a mitokondriális felvétel biztosítására. A médium eltávolítása után a sejteket 150 µl isopropanol hozzáadásával lizáltuk, majd 15 perc inkubációt követően plate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech) segítségével mértük az abszorbanciát 570 és 690 nm-en. Minden egyes kísérletnél 4 párhuzamosan összemért minta abszorbancia értékeinek átlagai adták az eredményt. A kísérleteket 3-szor ismételtük meg. A BC citotoxicitási hatás vizsgálatok alapja az abszorbancia értékek és az MTT-vel mért H9c2 sejt életképesség között lévő egyenes arányosság. A végső értékeket a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal szembeni béta-karotin kezelés utáni sejt túlélés, valamint a béta-karotinnal nem kezelt sejt túlélés hányadosaként, százalékban fejeztük ki.

### **3.2.8. Szöveti Antioxidáns Kapacitás (TAC) meghatározása (Önálló munka)**

A szív totál antioxidáns kapacitását a CS0790-1KT antioxidáns esszé kittel (Sigma-Aldrich Kft., Bp, Magyarország) mértük. A reperfúzió végén a szíveket lefagyasztottuk és  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a későbbi analízisig. Körülbelül 100 mg bal kamrai szívszövetet 0,5 ml „esszé puffer”-ben homogenizáltunk (IKA T10 basic ULTRA-TURRAX<sup>®</sup>), majd 12000 rpm-en centrifugáltuk 15 percig  $4^{\circ}\text{C}$ -on, és a felülúszókat használtuk az esszéhez. A mérés alapja ABTS szabadgyökös színreakció gátlása antioxidánsok segítségével, standard vegyületként Troloxot használva. A felhasználói kézikönyv szerinti minta előkészítést követően, plate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech) segítségével mértük az abszorbancia értékeket 405 nm-en. A TAC értékeket minden egyes szív esetében Trolox ekvivalensben ( $\mu\text{M}$ ) fejeztük ki.

### **3.2.9. Statisztikai analízis**

A statisztikai analíziseket a GraphPad Prism 5 szoftver segítségével végeztük. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM-ben fejeztük ki. A szívfunkciós paraméterek vizsgálatára egy utas ANOVA analízist követően Bonferroni poszt tesztet végeztünk. Az MTT adatokat Student t-teszttel hasonlítottuk össze. A Western blot, infarktusz terület és a TAC értékeit egy utas ANOVA tesztet követő Tukey poszt teszttel végeztük. A különbségeket  $p < 0.05$  értéknél szignifikánsnak tekintettük.

## **4. Eredmények**

### **4.1. Meggymagbél kivonattal végzett kísérletek eredményei**

Négy egér elpusztult a kísérletek lefolyása alatt; egy a kontroll csoportban, melyet izotóniás sóoldattal kezeltünk, egy a 250 mg/kg meggymagbél kivonattal kezelt csoportban, és kettő a 3000 mg/kg-mal kezelt csoportban. Az állatoknál elvégzett posztmortem vizsgálat nyelőső traumát állapított meg, ami nem toxicitásra utal, ezért ezeket a haláleseteket a nem megfelelő technikával végzett szondázásnak tulajdonítottuk és nem az SCSE káros fiziológiai hatásának.

#### **4.1.1. Makroszkópikus vizsgálatok**

Az állatok makroszkópikus vizsgálata nem bizonyított anatómiai eltérést vagy egyéb látható patológiai elváltozást. Az agy, szem, szív, tüdő, máj, hasnyálmirigy, lép, emésztő rendszer, vese, húgyúti rendszer, genitális rendszer, vázizomzat és bőr vizsgálata során semmilyen eltérést nem tapasztaltunk a kísérleti állatok hasonló szerveiben, a kontroll csoporthoz viszonyítva.

#### **4.1.2. Szérum metabolit és enzim aktivitás vizsgálat eredményei**

A máj és vese tömeg arányai, valamint a szérum metabolit és enzim aktivitás mérések eredményei a 6. táblázatban láthatóak. Eredményeink alapján elmondható, hogy nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kezelt csoportok és a kontroll csoport között egyik vizsgált paraméter esetén sem. Megjegyzendő továbbá, hogy a kezelt csoportok értékei között sincs szignifikáns különbség.

**6. táblázat:** Szerv/teljes testtömeg arányok, szérumban lévő metabolit és enzim aktivitás szintek mérésének eredményei

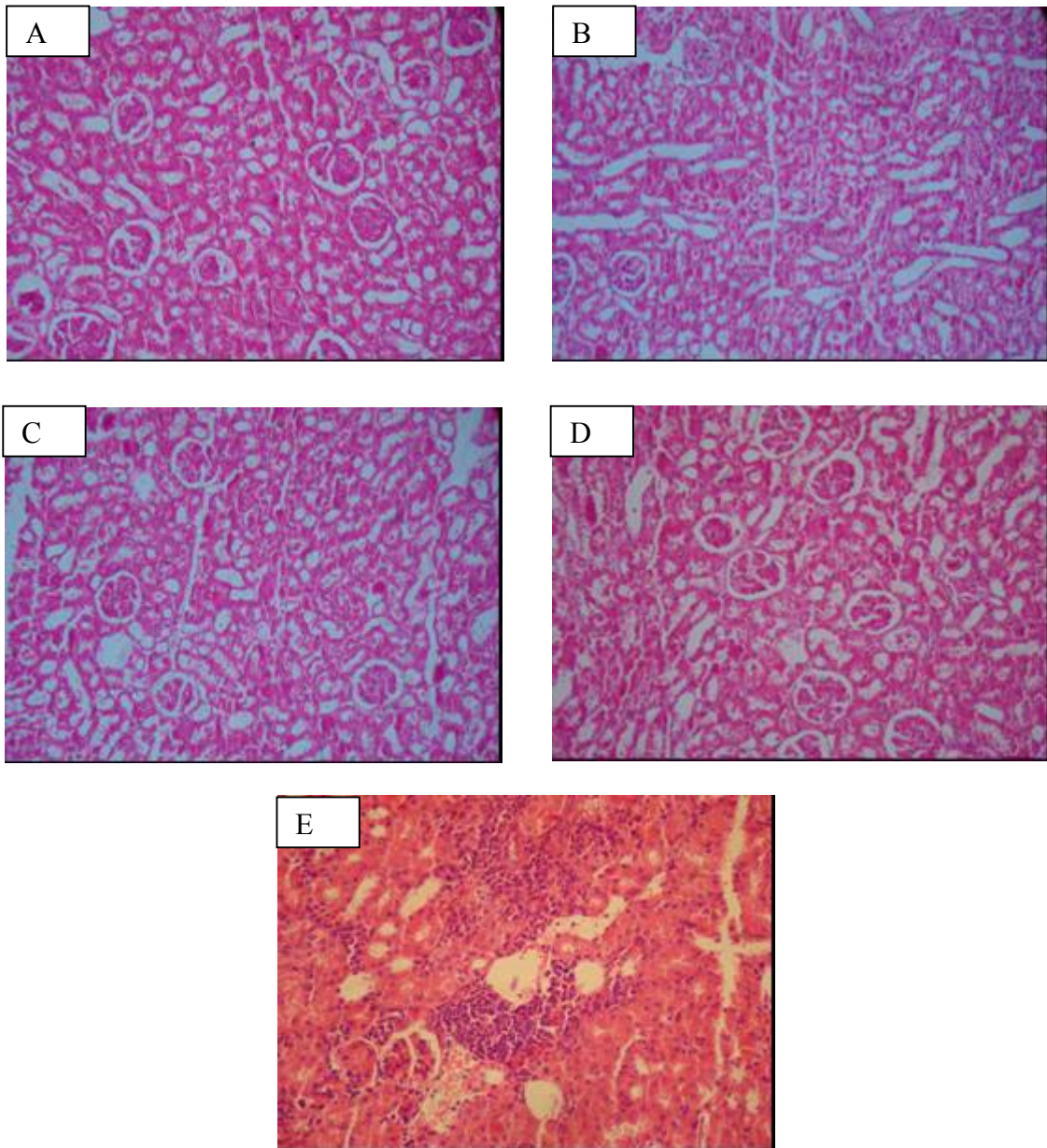
Csoport	Máj tömeg % ± SD	Vese tömeg % ± SD	BUN mg ± SD	Kreatinin mg ± SD	GOT NE/l ± SD	GPT NE/l ± SD	AlkFosz NE/l ± SD
Kontroll (n = 7)	5,78 ±0,69	5,78 ±0,7	17,6 ±5,1	0,66 ±0,4	234,4 ±93,5	45,43 ±10,6	480 ±103
250 mg/kg (n = 7)	5,95 ±0,74	5,66 ±0,8	16,3 ±3,4	0,55 ±0,19	165,7 ±40,19	38,7 ±7,02	447,6 ±188
500 mg/kg (n = 8)	5,9 ±0,45	5,65 ±0,57	17,125 ±4,0	0,57 ±0,12	212,6 ±112,6	53,4 ±12,6	510 ±126
1000 mg/kg (n = 8)	5,7 ±0,4	5,58 ±0,47	17,25 ±4,5	0,55 ±0,32	225,1 ±64	48,5 ±13,3	497 ±81
3000 mg/kg (n = 6)	6,05 ±0,33	6,14 ±0,8	18,83 ±5,1	0,5 ±0,21	234,83 ±54,76	52,3 ±18,5	481 ±43

Egerek 8 napos meggy-magbél kivonattal történő kezelését követően mért adatok. A szervek tömegét a testtömeg százalékában fejeztük ki minden állatnál, a vizsgált metabolit értékeket mg egységben, az enzimaktivitásokat NE/l egységben adtuk meg. SPSS szoftver segítségével határoztuk meg a statisztikailag szignifikáns értékeket, Student t-tesztet alkalmazva az egyes kezelt csoportok numerikus eredményeit a kontroll csoporthoz hasonlítva.  $p < 0,05$  a szignifikancia küszöbértéke a különböző csoportok tekintetében az egyes változóknál.

#### 4.1.3. Szövetpatológiai vizsgálatok eredményei

##### 4.1.3.1 A vese hisztopatológiai vizsgálata

Az 1. ábrán található reprezentatív képeken megfigyelhető, hogy a kontroll (1.A ábra) és a 250, 500, valamint 1000 mg/kg meggy-magbél kivonattal (1.B-D ábra) kezelt állatokból származó metszetek esetén a húgyúti- és véredények, ezen kívül a malpighi testek láthatóak és normálisak. Ellenben a 3000 mg/kg meggy-magbél kivonattal (1.E ábra) kezelt csoport állataiból származó vese metszetek képein kongeszció látható a vér- és húgyúti edényeken és szöveti mikrostruktúra változás figyelhető meg, mely gyulladás okozta károsodásra utal.

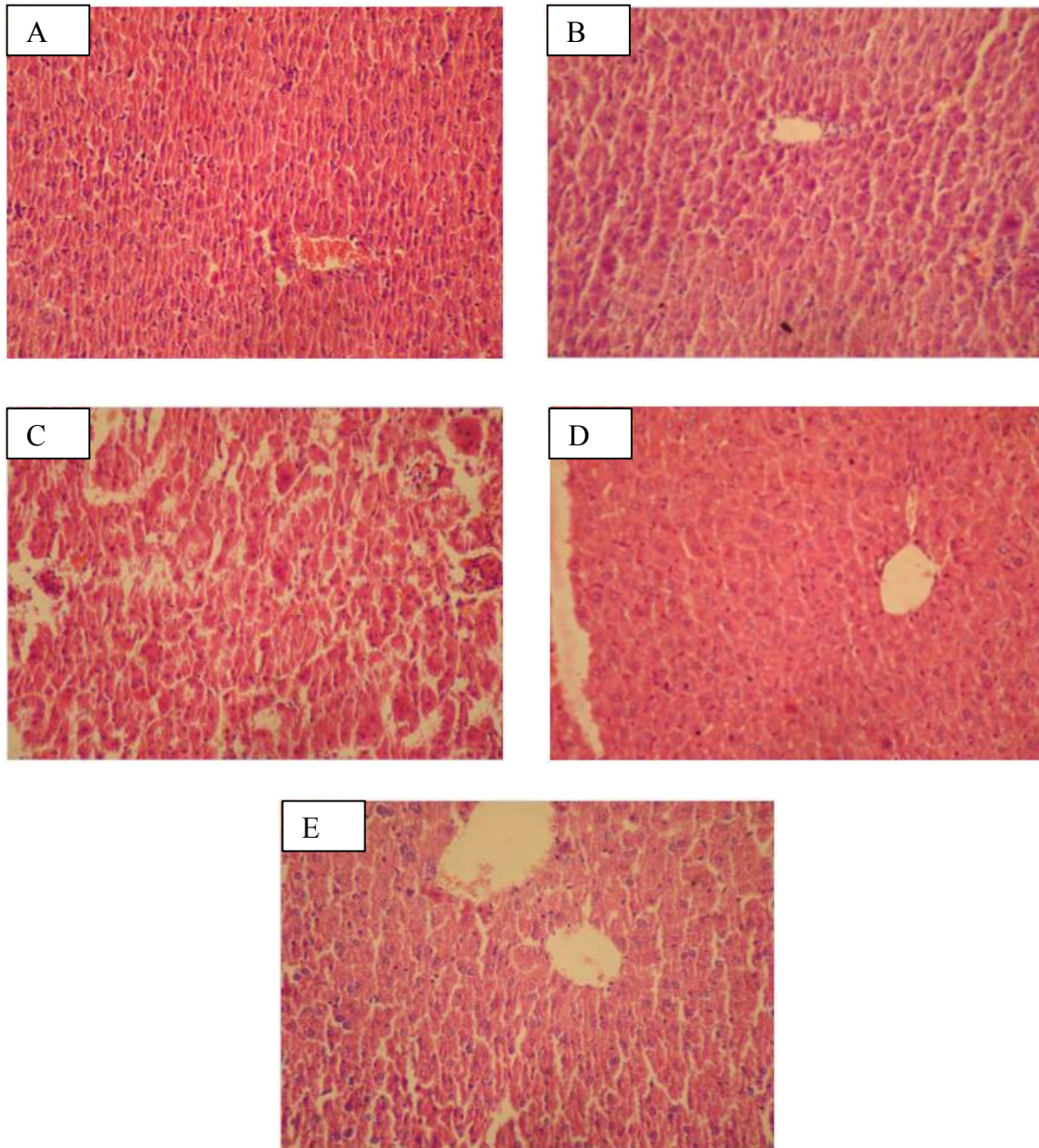


**1. ábra: A vese szövet hisztopatológiai vizsgálatának eredménye, hím C57BL/6J egerek 8 napos meggyombél kivonattal történő kezelését követően**

Az ábrán a vese medulláris részéből származó HE-nal festett 5 µm vékony metszetek láthatók. Az egyes képek az alábbi állatcsoportokból származnak; 'A' Normál sóoldattal kezelt kontroll csoport (10X nagyítás): nincs abnormalitás, 'B' 250 mg/kg SCSE-tal kezelt csoport (10X nagyítás): nincs abnormalitás, 'C' 500 mg/kg SCSE-tal kezelt csoport (10X nagyítás): nincs abnormalitás, 'D' 1000 mg/kg SCSE-tal kezelt csoport (10X nagyítás): nincs abnormalitás, 'E' 3000 mg/kg SCSE-tal kezelt csoport (20X nagyítás): gyulladásra utaló kongeszció a vér- és húgyúti edényeken.

#### 4.1.3.2. A máj hisztopatológiai vizsgálata

Az eredmények a 2. ábrán láthatóak, semmilyen eltérést nem tapasztaltunk egyik kezelt csoportban sem, a máj szövete morfológiailag épnek tűnt mindegyik dózistartományban.



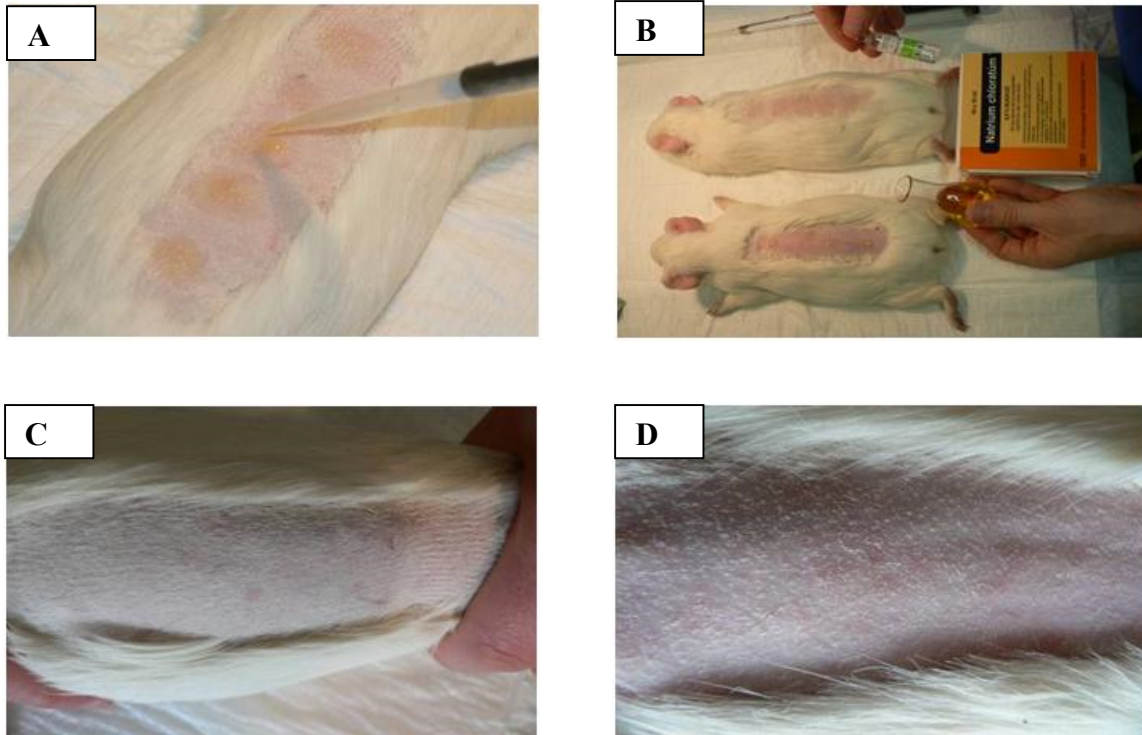
**2. ábra: A máj szövetének hisztopatológiai értékelése, hím C57BL/6J egerek 8 napos meggymagbél kivonattal történő kezelését követően**

Az ábrán a máj szövetének HE-nal festett 5  $\mu$ m vékony metszetei láthatók. Az egyes képeken az alábbi állatcsoportok metszetei; 'A' Normál sóoldattal kezelt kontroll csoport (10X nagyítás): nincs abnormalitás, 'B' 250 mg/kg SCSE-tal kezelt csoport (10X nagyítás): nincs abnormalitás, 'C' 500 mg/kg SCSE-tal kezelt csoport (20X nagyítás): nincs abnormalitás, 'D' 1000 mg/kg SCSE-tal kezelt csoport (20X nagyítás): nincs abnormalitás, 'E' 3000 mg/kg SCSE-tal kezelt csoport (10X nagyítás): nincs abnormalitás.

## 4.2. Meggymagbél olajjal végzett vizsgálatok

### 4.2.1. Bőr toxicitási vizsgálatok

A bőr toxicitási vizsgálatok eredményei a 3. ábrán láthatók. A kezeléseket (3.A,B ábra) követő 21 nap periódus eltelte alatt egyik kísérleti állaton sem láttunk negatív elváltozásokat a bőrön; allergiás- vagy más toxikus reakciókat, amit az olaj okozhatott, összehasonlítva a kontroll (3.D ábra) és a kezelt (3.C ábra) állatokat.

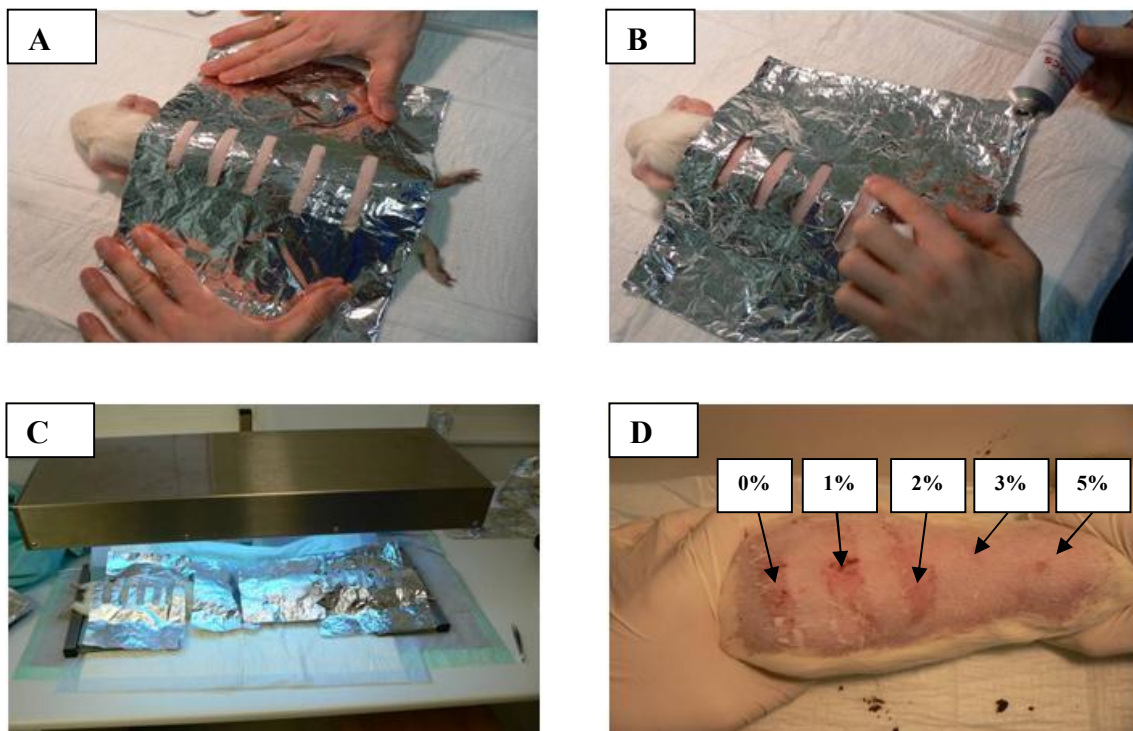


3. ábra: Bőr toxicitási vizsgálatok és eredményei

A meggymagbél olajjal kezelt tengerimalacok bőrét hasonlítottuk össze a fiziológias sóoldattal kezelt kontroll állatokkal (n=5 mindkét csoportban). A kezeléseket során 1, 2, 3, 4, és 5  $\mu$ l mag olajat alkalmaztunk a borotvált, szőrtelenített tengerimalac bőrön (A) és fiziológias sóoldatot a kontroll állatok hátán (B). 21 napot követően, káros hatások nem figyelhetők meg a bőrön az olajjal kezelt állatokon (C), nem látható különbség a kontroll csoporthoz képest sem (D).

#### 4.2.2. Meggymagbél olaj hatása UV sugárzás okozta károsodások kivédésére

A 4. ábrán láthatóak a meggymagbél olaj, UV fototoxicitás vizsgálatának eredményei. A sugárzást követő 2 óra elteltével a bőrön jelentős pirosság volt látható, mely maximumát 6 óra elteltével érte el, ekkor értékeltük a protektív hatást. Az 1 és 2 % olajat tartalmazó krémek nem mutattak protektivitást, azonban azok a krémek melyek meggymagbél olaj tartalma 3 és 5 % volt, jelentős mértékben védték a bőrt az UV sugárzás okozta bőrpír kialakulásával szemben.



4. ábra: Fototoxicitási vizsgálatok és eredményei

A teszt állatokat (n=5) gondosan leborotváltuk és a bőrükre alumínium fóliát helyeztünk, melyre 5 téglalap alakú rést vágunk (A). 0, 1, 2, 3, 5 tömeg% meggymagbél olajat tartalmazó karbamidos kenőcsöt alkalmaztunk a réseken (B), ezt követően 40 percig UVB sugárzásnak tettük ki (C) és 6 óra elteltével értékeltük a protektív hatást. A D ábrán láthatjuk az UV sugárzás hatását a vehikulummal (0% magolaj), és 1%, 2%, 3% és 5% magolajat tartalmazó kenőccsel kezelt bőrön.

### 4.3. Béta-karotinnal végzett kísérletek eredményei

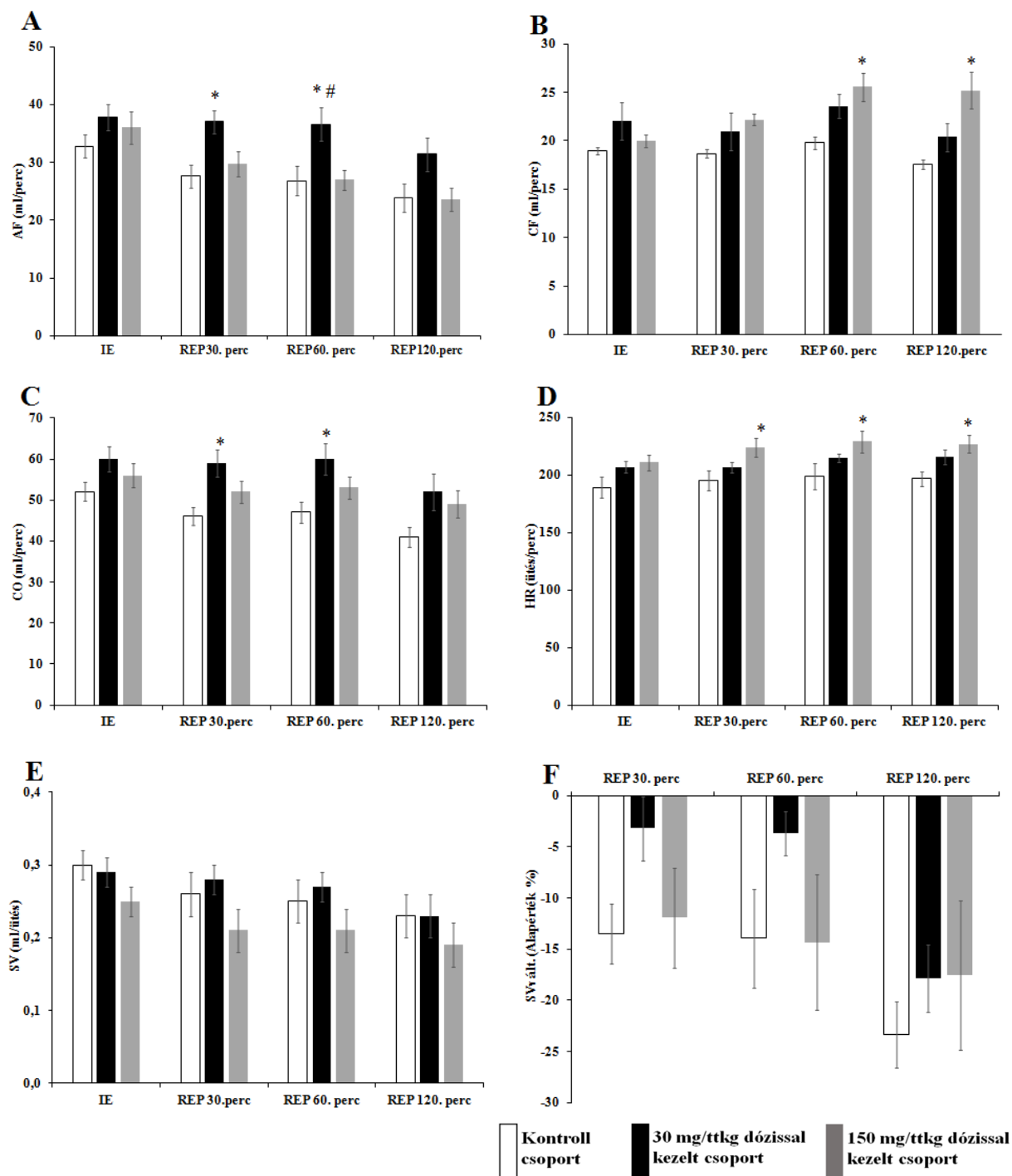
#### 4.3.1. Béta-karotin kezelések hatása a szívfunkciókra, iszkémia/reperfúzió átesett izolált szívekben

Az 5. ábrán látható a patkányok 4 hetes kezelését követően a szívizolálási protokoll során mért szívfunkció eredményei.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az aorta kiáramlás (AF) értékek (5.A ábra) nem különböztek szignifikánsan a kezelések hatására a kontroll csoporttal összehasonlítva az iszkémia előtt (IE). Megfigyelhető továbbá, hogy a 30 perc iszkémiát követő reperfúzió (REP) 30. és 60. percében az alacsony dózissal kezelt állatokból izolált szívek esetén szignifikánsan emelkedett aorta kiáramlást tapasztaltunk (\* $p < 0,05$ ). Megjegyzendő, hogy az alacsony dózisú kezelés hatására szignifikánsan magasabb AF értéket kaptunk a magas dózisú csoporthoz viszonyítva, a reperfúzió 60. percében (# $p < 0,05$ ). A koronária kiáramlás (CF) értékeit (5.B ábra) megvizsgálva látható, hogy a kezelések hatására nem volt szignifikáns változás iszkémia előtt, illetve 30 perc reperfúziót követően, míg a reperfúzió 60. és 120. percében a magas dózisú kezelés hatására a CF értékek szignifikánsan magasabbak voltak (\* $p < 0,05$ ) a kontroll csoporthoz viszonyítva.

Ugyancsak elmondható, hogy iszkémia előtt és a reperfúzió 120. percében nem tapasztaltunk szignifikáns változást a perctérfogat (CO) értékekben (5.C ábra) a béta-karotin kezeléseket követően, ellenben szignifikáns CO növekedést tapasztaltunk a reperfúzió 30. és 60. percében azon szívekben, melyek a 30 mg/ttkg béta-karotin dózissal kezelt állatokból származtak a kontroll csoporthoz viszonyítva (\* $p < 0,05$ ), a 150 mg/ttkg dózissal kezelt állatokból izolált szívek esetén nem tapasztaltunk szignifikáns változást. Látható továbbá, hogy azon állatok esetén, melyek 150 mg/ttkg béta-karotint kaptak, a szívfrekvencia (HR) (5.D ábra) szignifikáns mértékben nőtt (\* $p < 0,05$ ) reperfúzió során a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A béta-karotin kezelés hatását értékelve a szív verőtérfogata (SV) elmondható (5.E ábra), hogy sem iszkémia előtt, sem iszkémiát követően szignifikáns változásokat nem tapasztaltunk. A kísérlet teljes időtartama alatt nem tapasztaltunk a verőtérfogat változás (SVvált) (5.F ábra) eredményeiben sem szignifikáns mértékű változásokat egyik dózis tartományban sem.



### 5. ábra: Béta-karotin kezelés hatása a szívfunkciókra izolált dolgozó szívekben

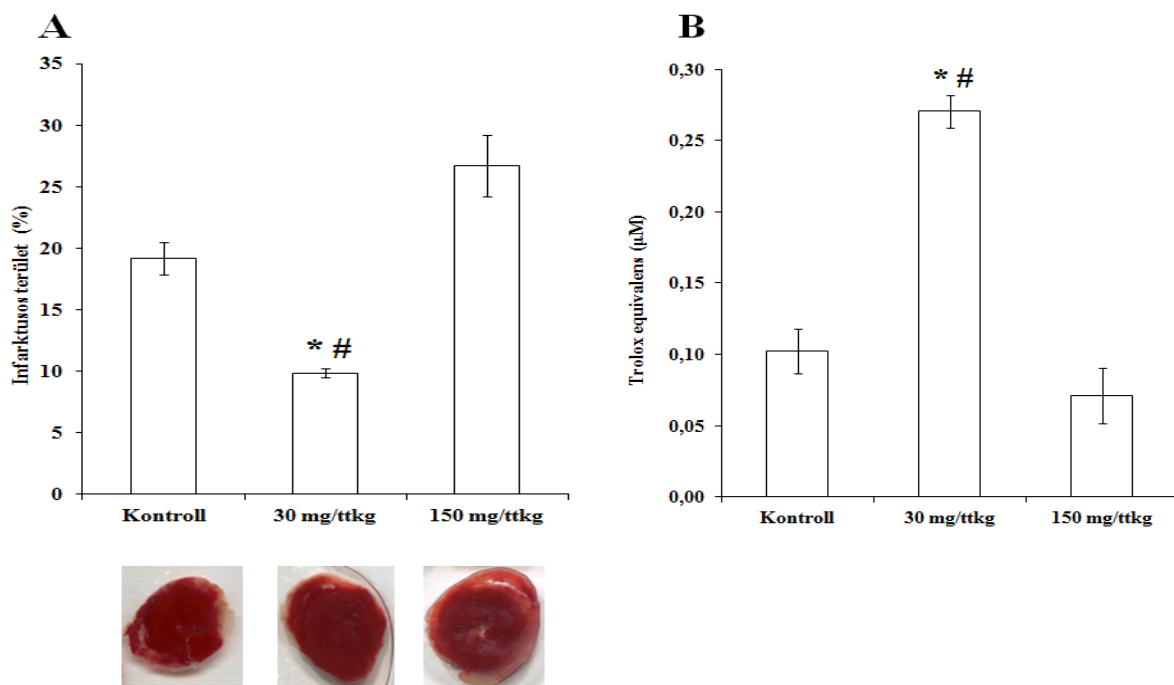
A szívetek 3 állatcsoportból izoláltuk (n=6 csoportonként). A kezelése során a patkányok hidroxetilcellulóz – víz (1:4) elegyét kapták a kontroll csoportban (fehér oszlop); 30 mg/ttkg/nap (fekete oszlop) béta-karotint, valamint 150 mg/ttkg/nap (szürke oszlop) béta-karotint a kezelése során. A szívetek minden egyes állatból izoláltuk, 30 perc iszkémiának, majd 120 perc reperfúzió alá vetettük az izolált „dolgozó-szív” apparátus segítségével, hogy iszkémia/reperfúzió okozta károsodásokat indukáljunk és különféle szívfunkciókat mérjünk. Az eredmények az egyes állatcsoportokban mért értékek átlagaként +/-

SEM lettek kifejezve; aorta kiáramlás (A), koronária kiáramlás (B), perctérfogat (C), szívfrekvencia (D), verőtérfogat (E) és a verőtérfogat változás (F). Statisztikai analízisre utas ANOVA-t követően Bonferroni poszt tesztet végeztünk. \* $p < 0,05$  kontroll csoport versus kezelt csoport. # $p < 0,05$  30 mg/ttkg dózissal kezelt csoport versus 150 mg/ttkg dózissal kezelt csoport

#### 4.3.2. A béta-karotin hatása az iszkémia/reperfúzió okozta infarktusos terület nagyságára és a szöveti antioxidáns kapacitásra (TAC)

A TTC oldattal perfuzált szívek metszeteinek makroszkópos analízise szignifikáns csökkenést mutatott az infarktusos szívizom kiterjedésében az alacsony dózisu kezelés esetén a kontroll csoport értékeihez képest (\* $p < 0,05$ ) (6.A ábra). Ez a protektív hatás azonban eltűnt azon szívekben, melyek a magas dózissal kezelt állatokból származtak (# $p < 0,05$ ) (6.A ábra).

Az infarktusos területben bekövetkezett változások szoros összefüggést mutatnak a szöveti antioxidáns kapacitással (6.B ábra). Az ábrán látható, hogy azon szívekben, melyek alacsony dózissal kezelt állatokból származtak; a TAC értékei egyaránt szignifikánsan magasabbak voltak a kontroll csoporthoz (\* $p < 0,05$ ) és a magas dózisu kezelést kapott állatokból izolált szívekhez képest (# $p < 0,05$ ) egyaránt.



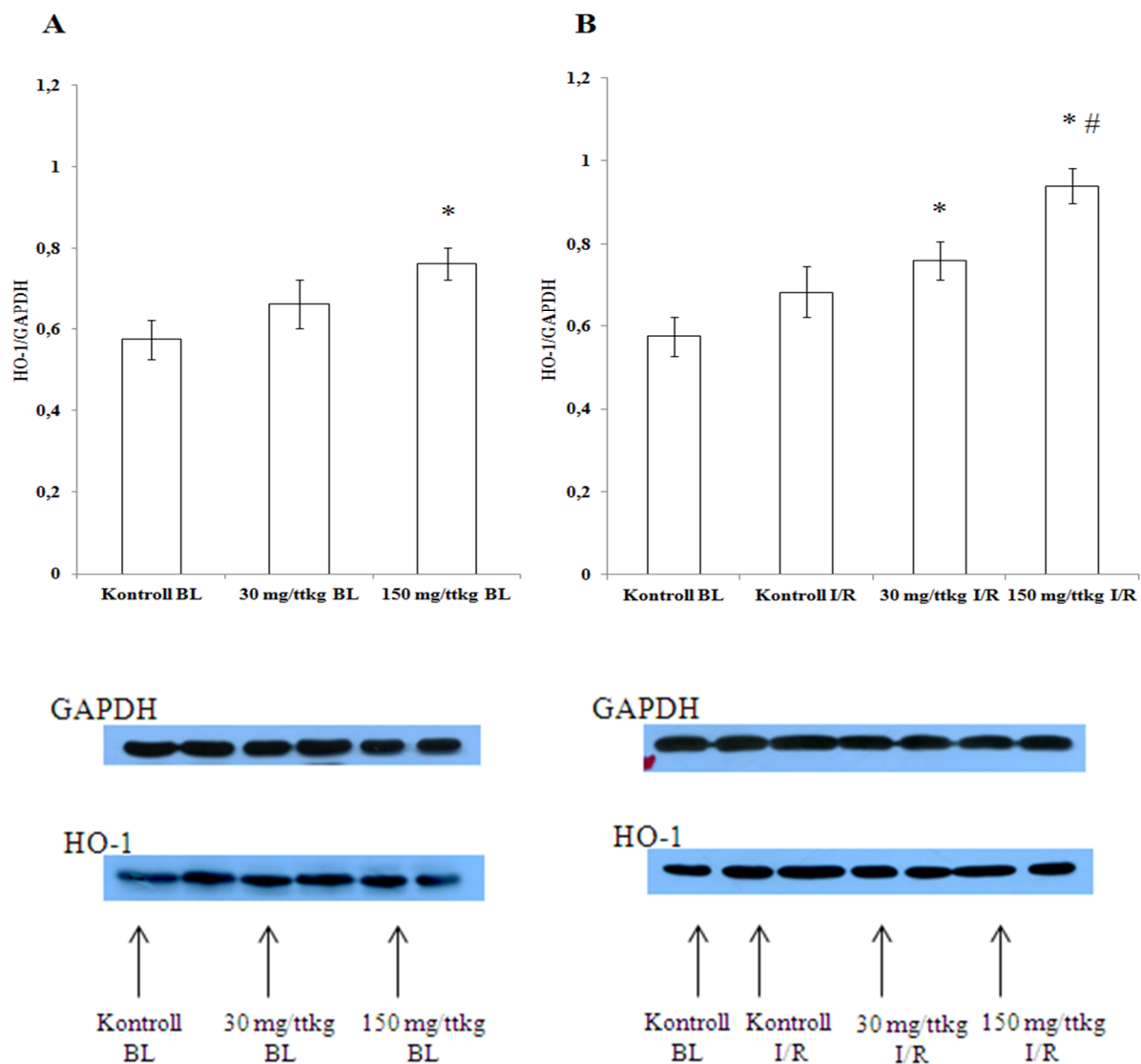
6. ábra: A béta-karotin hatása az infarktusos terület kiterjedésére (A) és a szöveti antioxidáns kapacitásra (B)

Az infarktus mértékét a szívekből (n=4) a 120 perc reperfúzió végeztével trifenil tetrazólium-klorid (TTC) oldattal történő perfúziót követően, makroszkópikus analízissel mértük a szívek transzverz szeleteiből. Minden egyes csoportban a szívekben mért infarktusos területek átlagait  $\pm$  SEM ábráztuk. A TAC értékek minden szövet mintából Trolox ekvivalensben ( $\mu$ M) lettek megadva  $\pm$  SEM csoportonként. Statisztikai analízisre egy utas ANOVA tesztet követően Tukey poszt tesztet alkalmaztunk.  $*p<0,05$  összehasonlítás, a vivőanyaggal kezelt kontrol állatok szíveiből származó értékekhez képest.  $\#P<0,05$  összehasonlítás, a magas dózissal kezelt állatok szívének értékeihez. A TAC értékek minden szövet mintából Trolox ekvivalensben ( $\mu$ M) lettek megadva  $\pm$  SEM csoportonként.  $*p<0,05$  kontroll csoport versus kezelt csoportok.  $\#p<0,05$  30 mg/ttkg dózissal kezelt csoport versus 150 mg/ttkg dózissal kezelt csoport.

#### 4.3.3. A béta-karotin hatása a hem-oxigenáz-1 (HO-1) fehérje expresszióra

Ahogy a 7. ábrán látható, a HO-1 enzim expresszióját iszkémia/reperfúzióknak nem kitett (BL) (7.A ábra) és kitett (I/R) (7.B ábra) szíveken egyaránt vizsgáltuk. A magas dózisú béta-karotin kezelés szignifikáns növekedést okozott az enzim expressziójában iszkémia/reperfúzióknak ki nem tett szívek esetén ( $*p<0,05$ ) (7.A ábra).

Továbbá, azon szívek, melyek a kezeletlen állatokból származtak és iszkémia/reperfúziós károsodást szenvedtek, a HO-1 fehérje termelés az iszkémia/reperfundált szívekben egyaránt az alacsony és magas dózissal szignifikáns emelkedést mutatott a kezeletlen nem-károsodott csoporthoz viszonyítva ( $*p<0,05$ ) (7.B ábra). Látható, hogy a HO-1 expressziója azon szíveknek, melyek vivőanyaggal kezelt állatokból származnak és iszkémia/reperfúzióknak estek át, nem különböztek szignifikáns mértékben azoktól a szívektől, melyek az alacsony dózissal kezelt állatokból származtak és iszkémia/reperfúzióknak estek át, míg a magas dózissal kezelt állatok HO-1 szintje szignifikáns emelkedést mutatott a vivőanyaggal kezelt iszkémia/reperfundált kontroll csoporthoz képest ( $\#p<0,05$ ) (7.B ábra).

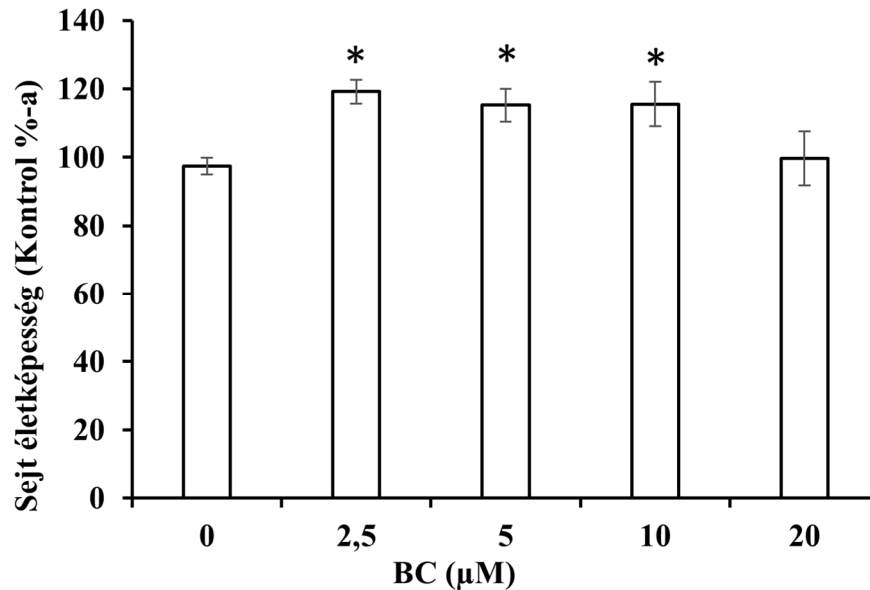


**7. ábra: A hem-oxigenáz-1 fehérje expressziójának vizsgálata  
Western blot analízissel**

A HO-1 fehérje expresszióját patkány szívizomban mértük, homogenizált szívszövet mintákból a kontroll vagy a béta-karotinnal kezelt szívekből, iszkémia/reperfúzió okozta károsodásokkal vagy anélkül. A Western blot analízist minden egyes szövet homogenizátumon triplikálva végeztük, és a kapott sávok jelintenzitását Image J program segítségével mértük, ahogy a fenti reprezentatív kép is mutatja. A fehérje koncentrációját a szövetben a HO-1 és a GAPDH fehérje arányaként kifejezett egységben adtuk meg. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM értékben fejeztük ki ( $n=6$ ). Statisztikai tesztek közül egy utas ANOVA tesztet követően Tukey poszt tesztet végeztünk. \* $p<0,05$  béta-karotinnal kezelt állatok szívei versus nem iszkémiás kontroll állatok szívei. # $p<0,05$  iszkémia/reperfúzió átesett béta-karotin kezelt állatok szívei versus iszkémia/reperfúzió károsodott kontroll állatok szívei.

#### 4.3.4. Béta-karotin citotoxicitásának vizsgálata

Kísérleteink során vizsgáltuk különböző dózisú béta-karotin és 125  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelések hatását H9c2 kardiomioblasztokon, MTT sejtéletképességi esszét használva. A 8. ábrán látható, hogy 2,5, 5, 10  $\mu\text{M}$  béta-karotin kezelés szignifikáns sejtéletképesség növekedést okozott (\* $p < 0,05$ ), míg 20  $\mu\text{M}$  esetén a tapasztalt protektív hatás eltűnt.



#### 8. ábra: Béta-karotin citotoxicitásának vizsgálata H9c2 sejteken

##### $\text{H}_2\text{O}_2$ okozta oxidatív körülmények között MTT esszé segítségével

A béta-karotin citotoxicitást H9c2 sejteken MTT esszé segítségével vizsgáltuk. H9C2 sejteket módosított Dulbecco médiumban 24 óráig növesztettük, majd 0, 2,5, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$  béta-karotinnal kezeltük, ezt követően 125  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -vel kezeltük 4 órán keresztül, majd 5 mg/ml MTT reagenst adtunk hozzá, végül a sejteket lizáltuk és az abszorbanciát 570 és 690 nm-en mértük. Az abszorbancia értékeket 4 párhuzamosan összemért lyuk átlagaként fejeztük ki és 3-szor ismételtük meg. Az eredményeket sejtéletképesség százalékban kifejezett átlagaként ábrázoltuk minden egyes béta-karotin dózisban, a béta-karotinnal nem kezelt kontroll kultúrákhoz viszonyítva. Student t-teszttel analizáltuk az eredmények közötti különbségeket. \* $p < 0,05$  béta-karotinnal kezelt sejt kultúra életképesség átlag százaléka versus béta-karotinnal nem kezelt sejt kultúra.

## 5. Megbeszélés

Nagy múltra tekint vissza a növényi eredetű anyagok betegségek gyógyítására való alkalmazása. A növényekből kinyert vegyületek terápiás felhasználása, napjainkban újra egyre nagyobb mértéket ölt. Ennek okaként megnevezhető, a természetes eredetű [101, 130, 131] hatóanyagok kedvezőbb mellékhatás profilja, kisebb gyakorisággal előforduló toxicitása az új szerkezetű szintetikus hatóanyagokkal szemben. A természetes növényi eredetű preparátumok az izolálni kívánt fő hatóanyagon kívül sokszor tartalmaznak olyan egyéb komponenseket, melyek felszívódásukat, oldékonyságukat, biológiai hasznosulásukat elősegíthetik.

Többek között a kardiovaszkuláris betegségek morbiditása és mortalitása is csökkenthető természetes eredetű hatóanyagokkal; például antioxidánsokkal [140]. Egyes növényekben található flavonoidok és más típusú vegyületek jelentős biológiai aktivitással bírnak, melyet a keringési- és emésztő rendszer területén fejtenek ki legfőképp. Hatásaik között lehet említeni a szabadgyökök inaktiválásán keresztüli antioxidáns hatásukat [141], továbbá a trombocita aggregáció [142] és trombus képződés gátlását, érfal stabilitás fokozását, szérum triglicerid szint csökkentését, lipidperoxidáció gátlását stb.

Jelen kísérletekben a rágcshalókon elvégzett dózis-hatás vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a meggy-magbél kezelés nem okoz semmilyen tünetet az állatokon, vagy változást a vizsgált laboratóriumi paraméterekben, melyek toxicitásra utalhatnak, még a korábbi kísérleteink során alkalmazott terápiás dózishatároktól jelentősen magasabb dózisok esetén sem. A kísérlet eredményeit kiértékelve, a meggy-magbél extraktummal kezelt állatokból származó vérminták értékei nem különböztek szignifikánsan a kontroll csoporttól.

Mivel a xenobiotikumok "ártalmatlanításáért" és eltávolításáért elsődlegesen a máj és a vese felelős, a különböző toxicitási vizsgálatok során ezen szervekre kifejtett hatásokat vizsgálják leggyakrabban. Ha egy ismeretlen hatóanyag extrém mértékben toxikus, erőteljes károsodást okoz mindkét szövetben, melynek eredményeként a szervek súlyának csökkenése, csakúgy mint szöveti elhalás és/vagy ödéma okozta súlynövekedés vagy abnormális sejtproliferáció tapasztalható [143]. Ilyen toxikus tünetek egyike sem volt megfigyelhető a kísérleteink során, a vizsgált szervek súlya nem különbözött szignifikánsan a kezelt csoporttól.

Különböző toxikus anyagok okozta károsodásokat ki lehet mutatni az abnormális szintű szérum biomarkerek segítségével, mint a máj és vese funkciók jelzőivel. Ezt jelzi a vér karbamid-nitrogén szintje például a vese alap filtrációs rátájának károsodása esetén [144]. A

szérum kreatinin szint emelkedését pedig specifikusan az elégtelen glomeruláris filtrációs ráta esetén, a glomerulus károsodása következtében tapasztalhatjuk [145]. A máj enzimek aktivitásának emelkedése az állatok szérumában egymástól függetlenül igen érzékeny betegségekre vagy toxikus anyagok jelenlétére [146]. Mindazonáltal ezek közül bármelyik magas szintje vagy hiánya okozhat aktív kóros állapotokat. Minthogy ezen enzimek szintje nem emelkedett az állatok teszt csoportjában a kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan, még az extrém magas dózisú meggy mag extraktumok esetén sem, alapot adhat a későbbiek során elvégzendő vizsgálatokhoz kiindulási értéként a minimális dózishatár és hatásos dózisok meghatározásánál.

A szövettani vizsgálatok eredményei szerint a meggy magból extraktumnak nincs kimutatható káros hatása a vese szövetének mikrostruktúrájára még 1000 mg/ttkg dózis esetén sem, míg a máj esetében a teljes dózistartomány biztonságosnak bizonyult. Megjegyzendő, hogy azon egerek, melyeket 3000 mg/ttkg dózissal kezeltünk, mikroszkópikus elváltozások voltak megfigyelhetőek a vese szövetében, ami utalhat gyulladási folyamatok aktiválódására. A tapasztalt elváltozás az alkalmazott dózis tartomány legfelső régiójában van, jelentősége a meggy magból extraktum humán felhasználásra való alkalmazásának szempontjából minimális. Mivel a meggy magban azonosított komponensek nem toxikusak, célul tűztük ki a kivonat humán kipróbálását. Világszerte vizsgálják különböző csonthéjas és nem csonthéjas növényi magvak egészségmegőrző hatásait. Egy kutatócsoport például vörös szőlőmag kezelést végzett 46 humán önkéntesen, melynek során a kezelések hatására a szervezet antioxidáns státuszát monitorozták a vizeletből [147]. Eredményeik alapján elmondható, hogy a 2 napos kezelést követően csökken redoxpotenciált tapasztaltak a vizeletben, mely általános antioxidáns kapacitás növekedést tükröz. Mivel a vizsgálatainkhoz használt kivonat hasonló összetevőket tartalmaz, mint a szőlőmag, valamint korábbi eredményeink [101, 102], és az itt bemutatott eredmények alapján kértük az OÉTI állásfoglalását az extraktum humán alkalmazásának kipróbálása érdekében. Az OÉTI a benyújtott adatok alapján, a biztonságosságot maximálisan szem előtt tartva, 350 mg vagy 600 mg maximális napi dózist javasolt a meggy magból egyéb összetevőinek függvényében. Kísérletes eredményeinket és az ezeken alapuló OÉTI ajánlást figyelembe véve a kivonat humán kipróbálására is sor került. Az elvégzett humán vizsgálatok alapján elmondható, hogy a meggy magból kivonat nem okozott semmilyen negatív elváltozást a vizsgált paraméterekben [115].

A meggy magolaj bőrre kifejtett hatását értékelve elmondható, hogy az olaj nem bizonyult sem allergénnek sem pedig irritálónak, ami korábbi vizsgálataink alapján várható

volt, hiszen az olaj számos citoprotektív komponenst tartalmaz, de toxikusakat ismereteink szerint nem. Továbbá a 3 % olajat tartalmazó karbamid alapú kenőcs protektív hatást mutatott UVB sugárzással szemben. Több kutatócsoport is vizsgálta antioxidáns vegyületek különféle hatásait; például az E-vitamint, orális adagolást követően fotoprotektív hatását bőrön [148], kezeléseket követően sejtkultúrán [149], míg mások helyileg alkalmazva találták infravörös A sugárzással szemben védőhatásúnak [150]. Az általunk azonosított meggymagbél olaj komponensek közül több is antioxidáns aktivitású vegyület, tehát a helyi alkalmazása során tapasztalt fotoprotekció jelensége feltételezhetően ezen vegyületeknek volt köszönhető.

Összefoglalva elmondható, hogy bár a meggymagbél kivonat nincs jelenleg humán alkalmazásban sem mint gyógyszer, sem mint táplálékkiegészítő, azonban a tapasztalt alacsony toxicitása alapján feltételezhető a magból készült termékek orális vagy egyéb belsőleges használata. Megjegyzendő azonban, hogy a meggymag kivonatot tartalmazó termékek kifejlesztéséhez és piacra történő bevezetésükhöz még további vizsgálatok szükségesek, melyekben a biztonságos alkalmazhatóságra vonatkozó paramétereket kell megvizsgálni. A hatályos rendelet részeként elvégzendők a klasszikus toxikológiai vizsgálatok, mint az egy dózisu (akut) és ismételt (szubakut, szubkrónikus, krónikus) toxicitás tesztek, valamint speciális vizsgálatok, például irritatív és a szenzibilizáló hatás, a genotoxicitás, a karcinogenitás; és szükség esetén a reprodukciót és a magzat fejlődést érintő toxikus hatások tesztelése.

A szív iszkémiás megbetegedéseiben kulcsfontosságú szerepe van az iszkémia/reperfúzió jelenségének. Az iszkémiás károsodást elszenvedett szerv felépülésében nélkülözhetetlen a reperfúzió jelensége, azonban tovább károsíthatja a szervek, szövetek funkcióját a folyamat során keletkező szabad gyökök által kiváltott fokozott mértékű oxidatív stressz. Az antioxidánsok képesek mérsékelni a szabad gyökök ártalmas hatásait, ezáltal csökkenteni a károsodás mértékét. Ezen jól ismert tényekből következően, egyre nagyobb az érdeklődés természetes eredetű növények és hatóanyagaik iránt, melyek képesek ezen betegségeket megelőzni vagy mérsékelni súlyosságukat.

Béta-karotinnal végzett kísérleteinket hím patkányokon végeztük. Mindenképp meg kell említeni, hogy a patkányokon mért adatok karotinoid kutatásban való felhasználásának ismert transzlációs korlátai vannak. Egy lényeges szempont a tanulmányok során, mint például ez esetben is, hogy habár az egerek és patkányok jól átalakítják a béta-karotint A-vitaminná a biohasznosulása a karotinoidoknak a bélből való abszorpción keresztül igen alacsony, ezért szuprafiziológiás béta-karotin dózisok adagolása szükséges, bármely természetes forrásból származó szintet jóval meghaladóan [151]. A kísérleteket úgy terveztük

meg, hogy részben ellensúlyozzák ezt a korlátot úgy, hogy a kezelések során minden esetben a fiziológiásnál magasabb dózisokat alkalmaztunk. Jelen tanulmányban még az alacsony dózis is nagyon magas, emberre átszámítva több mint 2g/nap/70 kg. Napi rendszerességgel a normál humán étrend 3 nagyságrenddel kisebb mennyiségű béta-karotint tartalmaz [152]. Kísérleteink eredményeinek hasznosítása a kardiovaszkuláris megbetegedések kezelésében, további humán táplálkozási vizsgálatok elvégzését követeli meg, csupán segítséget nyújthatnak a végső következtetések levonásához.

A bemutatott adatok ellenére, nem tehetünk átfogó mechanikus elemzést, azonban az a megfigyelés mely szerint az alacsony dózisú kezelés az iszkémiát követő reperfüzió 30. és 60. percében jelentősen javította az AF és CO értékeket, azonban ez a protektív hatás a reperfüzió 120. percében eltűnt arra utal, hogy a béta-karotin alacsony dózisban hatásos az oxidatív stresszt előidéző prooxidáns vegyületek keletkezésének csökkentésében, melyek az iszkémia/reperfüzió indukálta gyulladásos reakciók következtében keletkeznek. Ha ez így van, akkor feltételezhető az, hogy fokozott oxidatív stressz hosszabb reperfüziós periódusokkal, meghaladhatja a béta-karotin antioxidáns képességét, ésszerű lenne az a feltételezés, hogy a koncentráció növelésével fokozódik a protektív hatás. Azonban kísérleteink során a 150 mg/kg/nap dózisú kezelések esetén a protektív hatás eltűnését tapasztaltuk. A vizsgált két dózis között azonban ötszörös különbség van, mely elég nagy dózis intervallum ahhoz, hogy további kísérleteinkben kiegészítsük a kezeléseket a határértékek közötti dózisok hatásának vizsgálatával.

A szívfunkciók esetén tapasztalt változások összhangban vannak az infarktusz területének nagyságával. Látható, hogy a nagy dózisú kezelés esetén az alacsony dózissal tapasztalt protektív hatás eltűnt, ami szoros összefüggésben állhat a szöveti antioxidáns kapacitással (6. ábra). A kezelések következtében tapasztalt különbségekre a béta-karotinból az oxidatív stressz során keletkező további reaktív gyökök és bomlástermékek adhatnak magyarázatot. Már korábban megfigyelték, hogy a karotinoidek kölcsönhatásba léphetnek különböző szabadgyökökkel [153]. Bár a reakciók pontos mechanizmusa még nem tisztázott, feltételezik, hogy egy gyökös addíció során lipid-peroxil gyökök ( $\text{ROO}\cdot$ ) a karotinoid polién láncával reagálva egy C-központú gyököt képeznek ( $\text{ROO-CAR}\cdot$ ). A karotinoidek antioxidáns aktivitása függ a környezet parciális oxigén nyomásától, ezért feltételezhető, hogy ez a peroxil gyök reagálhat a molekuláris oxigénnel egy újabb peroxil gyököt ( $\text{ROO-CAR-OO}\cdot$ ) képezve [153]. Megfelelő parciális oxigén nyomás esetén ez pedig további gyököket generálhat tovább fokozva az oxidatív stresszt. Abban az esetben, ha az iszkémia/reperfüzió indukálta lipidperoxidáció egy ilyen reakciósort indít el és a nagy koncentrációban jelen levő béta-

karotin prooxidánssá válik, az magyarázatot ad az általunk tapasztalt totál antioxidáns kapacitás csökkenésre. Tovább erősíti ezt a feltételezést, hogy dózis-függő HO-1 expresszió növekedés volt megfigyelhető a szívszövetben, mindkét béta-karotin dózis esetében melyet az iszkémia/reperfúzió tovább fokozott (7. ábra), ami szintén alátámasztja azt a lehetőséget, mely szerint a dózisok emelésével a béta-karotin veszt antioxidáns kapacitásából és prooxidánssá válhat. Mivel a HO-1 szintjének emelkedése egy mindenütt jelenlévő antioxidáns válasz a legkülönbözőbb oxidatív stresszorokra, ezért várható, hogy az expresszió növekedni fog az iszkémia/reperfúziós károsodások következtében [154]. Továbbá ha feltételezzük, hogy az iszkémia/reperfúzió indukálja a béta-karotin fokozott oxidációját, akkor a HO-1 szint további emelkedése várható, ami a 7. B ábrán is megfigyelhető.

Ezt az elemzést alátámasztja, habár kis mértékben ugyan az *in vitro* MTT esszé eredménye is, amit a béta-karotin hatásának vizsgálatára végeztünk H9c2 miokardiális sejteken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> okozta oxidatív körülmények között. A kísérletek eredményei (8. ábra) azt mutatják, hogy azon sejtek életképessége szignifikáns mértékben növekedett a béta-karotinnal nem kezelt kontroll sejtekhez képest, melyek béta-karotint 2,5, 5 és 10 µM mennyiségben kaptak, azonban 20 µM kezelés hatására ez a hatás eltűnt. Habár ezek az adatok még hiányosak végleges következtetések levonásához, az eredmények azt sugallják, hogy a béta-karotin dózisának emelkedésével, a hatóanyag protektív hatása csökken.

Az itt bemutatott eredmények az alacsony dózisban alkalmazott béta-karotin nyilvánvaló kardioprotektív hatását bizonyítják, azonban ez a protekció csökken vagy eltűnik magasabb dózis esetén. Eredményeink háttérben álló mechanizmusok magyarázatára korábbi tanulmányok szolgáltatnak támpontot. Ahogyan az korábban említésre került, a szabadgyökök felelősek leginkább az oxidatív stressz kialakulásáért a gerincesek szöveteiben, melyek a béta-karotinnal reakcióba lépve prooxidáns degradációs termékek keletkezését okozzák, mint például az apo-8'-béta-karotenál, β-apo-10'-karotenál, β-apo-12'-karotenál [155] ami főképp a sejten belüli organelumokat, különösen a mitokondriumokat károsítják, ezzel a későbbiek folyamán zavart okozva a szívizom sejtek redox egyensúlyában, valamint fontos fehérjéket oxidálnak és tovább fokozzák a reperfúzió indukálta károsodásokat [156]. Irónikus módon, a HO-1 expressziós válasz az oxidatív stresszorokra szintén a kardioprotekció elvesztéséhez vezethet magas béta-karotin dózisok esetén. A HO-1 egy citoprotektív enzim, melynek három izoformja ismert (HO-1, 2 és 3), melyek közül a HO-1 indukálható forma. Indukcióját különböző hatások és anyagok, így szabadgyökök is fokozzák. Működése során O<sub>2</sub> és NADPH jelenlétében felhasítja a hem porfirinyűrűjét, amiből előbb nyíltláncú biliverdin, ami majd gyorsan antioxidáns tulajdonságú bilirubinná alakul. Ezek mellett szubtoxikus

menyiségű CO keletkezik, amiről már bizonyított, hogy citoprotektív hatásokkal rendelkezik. A folyamat harmadik terméke a porfirin gyűrűből felszabaduló vas II; benignus metabolit és könnyen eltávolítható; jelenléte meghatározhatja, hogy a béta-karotin antioxidánsként vagy prooxidánsként viselkedik [157]. Ezen tulajdonság potenciális következménye, hogy paradox összefüggésben van a HO-1 feltételezett szerepével. Normál esetben, ezen enzim növekedett aktivitása csökkenti az oxidatív stresszt és védi a szöveteket a toxikus behatástól. Andersen és munkatársai [157] leírták, hogy a béta-karotin prooxidáns tulajdonságait a  $Fe^{2+}$  növeli, vagyis az emelkedett HO-1 szint magas dózisú béta-karotin jelenlétében, potenciálisan elnyomhatja a HO-1 citoprotektív hatásait és növeli az oxidatív stressz mértékét a szövetben. Ezen kívül, az emelkedett  $Fe^{2+}$  szint és az iszkémia/reperfúzió által fokozott  $H_2O_2$  termelődés következtében fokozódhat a Fenton-reakció során keletkező OH<sup>-</sup> termelés, ami további károsodásokat okozhat. Ezek a következtetések azonban még nem bizonyítottak és további vizsgálatokat igényelnek a béta-karotin kardiovaszkuláris hatásaira vonatkozóan.

Összefoglalásként elmondható, hogy eredményeink arra engednek következtetni, hogy az iszkémia/reperfúzió indukálta HO-1 aktivitás növekedés fontos szerepet játszhat abban, hogy a béta-karotin protektív vegyületként viselkedik az iszkémia/reperfúzió indukálta szívmizomkárosodás kivédésében vagy pedig prooxidánsként hozzájárul a károsodások súlyosbodásához. A mechanizmusok pontos felderítéséhez azonban további kísérletekre van szükség.

## 6. Összefoglalás

Magyarország és a világ rossz egészségügyi statisztikai adatai, kellő okot szolgáltatnak az emberiségnek egészségük megóvására. Világszerte vezető halálokat képviselnek a kardiovaszkuláris megbetegedések, melyeknek egyik fő kockázati tényezője az elhízás. Ezen megbetegedésekben a szervezet folyamatosan fokozott oxidatív stressznek van kitéve. A már fennálló betegségek gyógyszeres kezelésén túlmenően napjainkban egyre nagyobb igény mutatkozik a prevencióra, valamint a terápiák kiegészítésére. Ennek megvalósításában főképp természetes eredetű hatóanyagok játszanak szerepet táplálékkiegészítők formájában. Kutatásaink irányultsága ezen hatóanyagok körére terjedt ki.

Kutatócsoportunk meggyomgébél toxicitásának vizsgálata során egér modellben nem talált káros hatásokra utaló jeleket a máj szövetében. A vese szövetében csak a legmagasabb alkalmazott dózis esetén figyeltünk meg gyulladásra utaló jeleket. Szintén nem tapasztaltunk semmilyen változást a vizsgált vér-biomarkerek szintjében a kezelések hatására. A mag olajtartalmát tengerimalacok bőrén tesztelve fotoprotektívnek bizonyult.

Béta-karotinnal végzett kísérleteinkben patkány modellt alkalmazva alacsony dózisban kardioprotekciót tapasztaltunk, négy hetes előkezelést követően. A protekció a posztisztkémias szívparaméterek javulásában, a csökkent mértékű infarktusz területben, az emelkedett szöveti antioxidáns kapacitásban, valamint a H9c2 sejtek életképességének növekedésében nyilvánul meg. Megjegyzendő, hogy a tapasztalt protektív hatások a magas dózis esetén eltűntek az emelkedett HO-1 szint ellenére.

Eredményeink mindkét természetes eredetű anyag esetében hozzájárulhatnak azok terápiás prevencióra történő alkalmazásában amennyiben későbbi kísérletek is ezt megerősítik, valamint a velük kapcsolatos tudományos ismereteink bővítéséhez.

## 7. Summary

The devastating health statistics of Hungary and the World are sufficient reason to humans to change their lifestyle. Cardiovascular diseases are leading cause of death worldwide and one of the main risk factor is obesity. In these conditions the body suffers from continuously elevated oxidative stress. Nowadays, besides to the medical treatment of an existing disease, there is a growing demand for prevention and supplementary therapy. Substances with natural origin are able to fulfill the requirements due to their favorable toxicological and side effect profile.

In our experiments we studied the toxicological profile of sour cherry seed kernel in a mouse model. No sign of liver and kidney toxicity were found during the experiments. Moreover, we examined the photo protective properties of creams containing sour cherry seed kernel oil in different concentration in a guinea pig model. Our results demonstrated that sour cherry seed kernel oil did not show any allergic or toxic effect on the skin and possess photo protective effect.

In further experiments we investigated the effect of low versus high dose beta-carotene treatment using rat model. The low-dose pretreatment resulted in cardioprotection evidenced by recovery of postischemic heart functions, decreased infarct size, not significantly but increased HO-1 enzyme expression and elevated tissue antioxidant capacity. In case of high dose treated animals we failed to observe any protection on the heart challenged by ischemia/reperfusion.

Outcomes of our research may contribute to use in prevention both materials with natural origin, as well as to extend the scientific knowledge related to them.

## 8. Irodalomjegyzék

1. KSH. *Halálozások a gyakoribb halálokok szerint (1990–)*. 2016 [cited 2016 01.28.]; Available from: [https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat\\_eves/i\\_wnh001.html](https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_wnh001.html).
2. Ph.D., P.D.C.I. *A kardiovaszkuláris betegségek prevenciójának és rehabilitációjának aktualitásai*. 2013 [cited 2016 01.29.]; Available from: [http://demin.hu/files/userfiles/DEMIN\\_XIII/2-nap/KARD-3-CZI-E.pdf](http://demin.hu/files/userfiles/DEMIN_XIII/2-nap/KARD-3-CZI-E.pdf).
3. Worldometers. 2016 [cited 2016 01.29. 14:40]; Available from: <http://www.worldometers.info/hu/>.
4. KSH. *Egészségügyi kiadások alakulása (2003–)*. 2016 [cited 2016 01.28.]; Available from: [https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat\\_eves/i\\_fec001.html](https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_fec001.html).
5. Rosenzweig, C., et al., *Potential impacts of climate change on citrus and potato production in the US*. *Agricultural Systems*, 1996. **52**(4): p. 455-479.
6. Wang, S.Y. and W. Zheng, *Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry*. *J Agric Food Chem*, 2001. **49**(10): p. 4977-82.
7. Moretti, C.L., et al., *Climate changes and potential impacts on postharvest quality of fruit and vegetable crops: A review*. *Food Research International*, 2010. **43**(7): p. 1824-1832.
8. Favela-Hernandez, J.M., et al., *Chemistry and Pharmacology of Citrus sinensis*. *Molecules*, 2016. **21**(2).
9. Gattuso, G., et al., *Flavonoid composition of Citrus juices*. *Molecules*, 2007. **12**(8): p. 1641-73.
10. Manthey, J.A., *Fractionation of orange peel phenols in ultrafiltered molasses and mass balance studies of their antioxidant levels*. *J Agric Food Chem*, 2004. **52**(25): p. 7586-92.
11. Rangel-Huerta, O.D., et al., *Normal or High Polyphenol Concentration in Orange Juice Affects Antioxidant Activity, Blood Pressure, and Body Weight in Obese or Overweight Adults*. *J Nutr*, 2015. **145**(8): p. 1808-16.
12. Lapcik, O., et al., *Isoflavonoids in the Rutaceae family: 1. Fortunella obovata, Murraya paniculata and four Citrus species*. *Phytochem Anal*, 2004. **15**(5): p. 293-9.
13. Leuzzi, U., et al., *Flavonoids in pigmented orange juice and second-pressure extracts*. *J Agric Food Chem*, 2000. **48**(11): p. 5501-6.
14. Rani, G., L. Yadav, and S.B. Kalidhar, *Chemical Examination of Citrus sinensis Flavedo Variety Pineapple*. *Indian J Pharm Sci*, 2009. **71**(6): p. 677-9.

15. Gil-Izquierdo, A., et al., *In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(2): p. 1035-41.
16. Stoggl, W.M., et al., *Capillary electrochromatography of biologically relevant flavonoids*. Electrophoresis, 2006. **27**(4): p. 787-92.
17. Li, S., et al., *Efficient and scalable method in isolation of polymethoxyflavones from orange peel extract by supercritical fluid chromatography*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **846**(1-2): p. 291-7.
18. Matsubara, Y., et al., *Structures of new cyclic peptides in young unshiu (Citrus unshiu Marcov.), orange (Citrus sinensis Osbeck.) and amanatsu (Citrus natsudaidai) peelings*. Agric Biol Chem, 1991. **55**(12): p. 2923-9.
19. Savary, B.J., et al., *Structural characterization of the thermally tolerant pectin methylesterase purified from citrus sinensis fruit and its gene sequence*. J Agric Food Chem, 2013. **61**(51): p. 12711-9.
20. Prakash Maran, J., et al., *Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel*. Carbohydr Polym, 2013. **97**(2): p. 703-9.
21. Rauf, A., G. Uddin, and J. Ali, *Phytochemical analysis and radical scavenging profile of juices of Citrus sinensis, Citrus anrantifolia, and Citrus limonum*. Org Med Chem Lett, 2014. **4**: p. 5.
22. Escudero-Lopez, B., et al., *Fermented orange juice: source of higher carotenoid and flavanone contents*. J Agric Food Chem, 2013. **61**(37): p. 8773-82.
23. Wibowo, S., et al., *Colour and carotenoid changes of pasteurised orange juice during storage*. Food Chem, 2015. **171**: p. 330-40.
24. Aschoff, J.K., et al., *Correction to in vitro bioaccessibility of carotenoids, flavonoids, and vitamin C from differently processed oranges and orange juices [Citrus sinensis (L.) Osbeck]*. J Agric Food Chem, 2015. **63**(9): p. 2582.
25. Mirhosseini, H., et al., *Solid-phase microextraction for determining twelve orange flavour compounds in a model beverage emulsion*. Phytochem Anal, 2008. **19**(5): p. 429-37.
26. Jabri Karoui, I. and B. Marzouk, *Characterization of bioactive compounds in Tunisian bitter orange (Citrus aurantium L.) peel and juice and determination of their antioxidant activities*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 345415.
27. Barros, H.R., T.A. Ferreira, and M.I. Genovese, *Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil*. Food Chem, 2012. **134**(4): p. 1892-8.

28. Mehmood, B., et al., *Short communication: in vitro assessment of antioxidant, antibacterial and phytochemical analysis of peel of Citrus sinensis*. Pak J Pharm Sci, 2015. **28**(1): p. 231-9.
29. Van Hung, P., P.T. Chi, and N.T. Phi, *Comparison of antifungal activities of Vietnamese citrus essential oils*. Nat Prod Res, 2013. **27**(4-5): p. 506-8.
30. Bagavan, A., et al., *Antiplasmodial activity of botanical extracts against Plasmodium falciparum*. Parasitol Res, 2011. **108**(5): p. 1099-109.
31. Camarda, L., et al., *Antiproliferative activity of Citrus juices and HPLC evaluation of their flavonoid composition*. Fitoterapia, 2007. **78**(6): p. 426-9.
32. Trovato, A., et al., *Effects of fruit juices of Citrus sinensis L. and Citrus limon L. on experimental hypercholesterolemia in the rat*. Phytomedicine, 1996. **2**(3): p. 221-7.
33. Gamboa-Gomez, C.I., et al., *Plants with potential use on obesity and its complications*. EXCLI J, 2015. **14**: p. 809-31.
34. Barreca, D., et al., *First evidence of C- and O-glycosyl flavone in blood orange (Citrus sinensis (L.) Osbeck) juice and their influence on antioxidant properties*. Food Chem, 2014. **149**: p. 244-52.
35. Sae-Teaw, M., et al., *Serum melatonin levels and antioxidant capacities after consumption of pineapple, orange, or banana by healthy male volunteers*. J Pineal Res, 2013. **55**(1): p. 58-64.
36. Machi, J.F., et al., *Impact of aging on cardiac function in a female rat model of menopause: role of autonomic control, inflammation, and oxidative stress*. Clin Interv Aging, 2016. **11**: p. 341-50.
37. Ramallo Guevara, C., et al., *Global protein oxidation profiling suggests efficient mitochondrial proteome homeostasis during ageing*. Mol Cell Proteomics, 2016.
38. Prangthip, P., et al., *An Improvement of Oxidative Stress in Diabetic Rats by Ubiquinone-10 and Ubiquinol-10 and Bioavailability after Short- and Long-Term Coenzyme Q Supplementation*. J Diet Suppl, 2016: p. 1-13.
39. Mateen, S., et al., *Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis*. PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0152925.
40. Moreira, P.I., et al., *Detection and localization of markers of oxidative stress by in situ methods: application in the study of Alzheimer disease*. Methods Mol Biol, 2010. **610**: p. 419-34.
41. Tucker, P.S., et al., *Clinical and research markers of oxidative stress in chronic kidney disease*. Biomarkers, 2013. **18**(2): p. 103-15.

42. Fournier, P., et al., *Homocysteine in Chronic Heart Failure*. Clin Lab, 2015. **61**(9): p. 1137-45.
43. Lushchak, V.I., *Free Radicals, Reactive Oxygen Species, Oxidative Stresses and Their Classifications*. Ukr Biochem J, 2015. **87**(6): p. 11-8.
44. Chuang, G.C., et al., *Environmentally Persistent Free Radicals Cause Apoptosis in HL-1 Cardiomyocytes*. Cardiovasc Toxicol, 2016.
45. Erika, D.K., *Az IGF-1 és a rendszeres testedzés hatása az öregedés molekuláris folyamataira: a sirtuinok szerepe*. 2011.
46. Bentley, D.J., et al., *Acute and Chronic Effects of Antioxidant Supplementation on Exercise Performance*. 2015.
47. Tasdemir, S., et al., *Effect of endogen-exogenous melatonin and erythropoietin on dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis*. Fundam Clin Pharmacol, 2013. **27**(3): p. 299-307.
48. Reiter, R.J., et al., *A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant*. J Pineal Res, 1995. **18**(1): p. 1-11.
49. Parlakpinar, H., et al., *Physiological and pharmacological concentrations of melatonin protect against cisplatin-induced acute renal injury*. J Pineal Res, 2002. **33**(3): p. 161-6.
50. Reiter, R.J., et al., *Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **854**: p. 410-24.
51. Reiter, R.J., et al., *Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review*. J Biomed Sci, 2000. **7**(6): p. 444-58.
52. Antolin, I., et al., *Antioxidative protection in a high-melatonin organism: the dinoflagellate Gonyaulax polyedra is rescued from lethal oxidative stress by strongly elevated, but physiologically possible concentrations of melatonin*. J Pineal Res, 1997. **23**(4): p. 182-90.
53. Antolin, I., et al., *Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes*. FASEB J, 1996. **10**(8): p. 882-90.
54. Misan, A., et al., *Antioxidant activity of medicinal plant extracts in cookies*. J Food Sci, 2011. **76**(9): p. C1239-44.
55. Papay, Z.E., et al., *[Pharmaceutical and formulation aspects of Petroselinum crispum extract]*. Acta Pharm Hung, 2012. **82**(1): p. 3-14.

56. Kuzma, P., B. Druzynska, and M. Obiedzinski, *Optimization of extraction conditions of some polyphenolic compounds from parsley leaves (Petroselinum crispum)*. Acta Sci Pol Technol Aliment, 2014. **13**(2): p. 145-54.
57. Saha, S., et al., *Anti-Bacterial effect of Aqueous Garlic Extract (AGE) determined by Disc Diffusion Method against Escherichia coli*. Mymensingh Med J, 2016. **25**(1): p. 23-6.
58. Jain, S., S.C. Agarwal, and S. Malaiya, *Antimycotic effect of fixed oils treated with herbal seeds on the growth of fungi causing otomycosis*. Anc Sci Life, 1993. **13**(1-2): p. 160-4.
59. Saw, J.T., et al., *Potential drug-herb interaction with antiplatelet/anticoagulant drugs*. Complement Ther Clin Pract, 2006. **12**(4): p. 236-41.
60. Ried, K., N. Travica, and A. Sali, *The effect of aged garlic extract on blood pressure and other cardiovascular risk factors in uncontrolled hypertensives: the AGE at Heart trial*. Integr Blood Press Control, 2016. **9**: p. 9-21.
61. Shin, J.H., et al., *Short-term heating reduces the anti-inflammatory effects of fresh raw garlic extracts on the LPS-induced production of NO and pro-inflammatory cytokines by downregulating allicin activity in RAW 264.7 macrophages*. Food Chem Toxicol, 2013. **58**: p. 545-51.
62. Cavagnaro, P.F., et al., *Effect of cooking on garlic (Allium sativum L.) antiplatelet activity and thiosulfates content*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(4): p. 1280-8.
63. Bi, X., et al., *Evaluation of antioxidant capacity of Chinese five-spice ingredients*. Int J Food Sci Nutr, 2015. **66**(3): p. 289-92.
64. Cortes-Rojas, D.F., C.R. de Souza, and W.P. Oliveira, *Clove (Syzygium aromaticum): a precious spice*. Asian Pac J Trop Biomed, 2014. **4**(2): p. 90-6.
65. Gunawardena, D., et al., *Anti-inflammatory activity of cinnamon (C. zeylanicum and C. cassia) extracts - identification of E-cinnamaldehyde and o-methoxy cinnamaldehyde as the most potent bioactive compounds*. Food Funct, 2015. **6**(3): p. 910-9.
66. Hadrich, F., et al., *Antioxidant and lipase inhibitory activities and essential oil composition of pomegranate peel extracts*. J Oleo Sci, 2014. **63**(5): p. 515-25.
67. Lu, Q.Y., et al., *Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid-soluble bioactive substances*. J Nutr Biochem, 2005. **16**(1): p. 23-30.
68. Khan, N., et al., *Cocoa polyphenols and inflammatory markers of cardiovascular disease*. Nutrients, 2014. **6**(2): p. 844-80.

69. Leontowicz, H., et al., *Bioactivity and nutritional properties of hardy kiwi fruit Actinidia arguta in comparison with Actinidia deliciosa 'Hayward' and Actinidia eriantha 'Bidan'*. Food Chem, 2016. **196**: p. 281-91.
70. Li, R., et al., *Qualitative and quantitative analysis of curcuminoids in herbal medicines derived from Curcuma species*. Food Chem, 2011. **126**(4): p. 1890-5.
71. Margina, D., et al., *Assessment of the potential health benefits of certain total extracts from Vitis vinifera, Aesculus hyppocastanum and Curcuma longa*. Exp Ther Med, 2015. **10**(5): p. 1681-1688.
72. Cacciola, F., et al., *Chemical characterisation of old cabbage (Brassica oleracea L. var. acephala) seed oil by liquid chromatography and different spectroscopic detection systems*. Nat Prod Res, 2016. **30**(14): p. 1646-54.
73. Raiola, A., et al., *Bioactive Compound Content and Cytotoxic Effect on Human Cancer Cells of Fresh and Processed Yellow Tomatoes*. Molecules, 2015. **21**(1): p. E33.
74. Patki, G., et al., *Grape powder treatment prevents anxiety-like behavior in a rat model of aging*. Nutr Res, 2015. **35**(6): p. 504-11.
75. Lin, A.D., et al., *Protective effects of grape suspension on in vivo ischaemia/reperfusion of the rabbit bladder*. BJU Int, 2005. **96**(9): p. 1397-402.
76. Pataki, T., et al., *Grape seed proanthocyanidins improved cardiac recovery during reperfusion after ischemia in isolated rat hearts*. Am J Clin Nutr, 2002. **75**(5): p. 894-9.
77. Atrooz, O.M., *The antioxidant activity and polyphenolic contents of different plant seeds extracts*. Pak J Biol Sci, 2009. **12**(15): p. 1063-8.
78. Cetojevic-Simin, D.D., et al., *Bioactivity of Meeker and Willamette raspberry (Rubus idaeus L.) pomace extracts*. Food Chem, 2015. **166**: p. 407-13.
79. Beekwilder, J., R.D. Hall, and C.H. de Vos, *Identification and dietary relevance of antioxidants from raspberry*. Biofactors, 2005. **23**(4): p. 197-205.
80. Lee, J., M. Dossett, and C.E. Finn, *Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing*. Food Chemistry, 2012. **130**(4): p. 785-796.
81. Zhang, L., et al., *Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition*. Food Chemistry, 2010. **119**(2): p. 592-599.
82. Denev, P., et al., *Antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities of herb extracts*. Acta Biochim Pol, 2014. **61**(2): p. 359-67.

83. Colak, N., et al., *Bog bilberry phenolics, antioxidant capacity and nutrient profile*. Food Chem, 2016. **201**: p. 339-49.
84. Heffels, P., F. Weber, and A. Schieber, *Influence of Accelerated Solvent Extraction and Ultrasound-Assisted Extraction on the Anthocyanin Profile of Different Vaccinium Species in the Context of Statistical Models for Authentication*. J Agric Food Chem, 2015. **63**(34): p. 7532-8.
85. Michalska, A. and G. Lysiak, *Bioactive Compounds of Blueberries: Post-Harvest Factors Influencing the Nutritional Value of Products*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(8): p. 18642-63.
86. Barbosa, P.O., et al., *Acai (Euterpe oleracea Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women*. Nutrition, 2015.
87. Xie, Z., et al., *Daily consumption of a mangosteen-based drink improves in vivo antioxidant and anti-inflammatory biomarkers in healthy adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial*. Food Sci Nutr, 2015. **3**(4): p. 342-8.
88. Peixoto, H., et al., *An Anthocyanin-Rich Extract of Acai (Euterpe precatorea Mart.) Increases Stress Resistance and Retards Aging-Related Markers in Caenorhabditis elegans*. J Agric Food Chem, 2016. **64**(6): p. 1283-90.
89. Liu, Q.Y., Y.T. Wang, and L.G. Lin, *New insights into the anti-obesity activity of xanthones from Garcinia mangostana*. Food Funct, 2015. **6**(2): p. 383-93.
90. Xie, Z., et al., *Functional beverage of Garcinia mangostana (mangosteen) enhances plasma antioxidant capacity in healthy adults*. Food Sci Nutr, 2015. **3**(1): p. 32-8.
91. Abdallah, H.M., et al., *Phenolics from Garcinia mangostana Inhibit Advanced Glycation Endproducts Formation: Effect on Amadori Products, Cross-Linked Structures and Protein Thiols*. Molecules, 2016. **21**(2).
92. Li, G., et al., *Gartanin, an isoprenylated xanthone from the mangosteen fruit (Garcinia mangostana), is an androgen receptor degradation enhancer*. Mol Nutr Food Res, 2016.
93. Kan, T., et al., *Phenolic compounds and vitamins in wild and cultivated apricot (Prunus armeniaca L.) fruits grown in irrigated and dry farming conditions*. Biol Res, 2014. **47**: p. 46.
94. Rudzinska, M., et al., *Sterols and squalene in apricot (Prunus armeniaca L.) kernel oils: the variety as a key factor*. Nat Prod Res, 2016: p. 1-5.

95. Lee, H.H., et al., *Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of apricot seed*. *Phytother Res*, 2014. **28**(12): p. 1867-72.
96. Gandhi, V.M., et al., *Safety evaluation of wild apricot oil*. *Food Chem Toxicol*, 1997. **35**(6): p. 583-7.
97. Chaouali, N., et al., *Potential Toxic Levels of Cyanide in Almonds (*Prunus amygdalus*), Apricot Kernels (*Prunus armeniaca*), and Almond Syrup*. *ISRN Toxicol*, 2013. **2013**: p. 610648.
98. Homoki, J.R., et al., *Anthocyanin composition, antioxidant efficiency, and alpha-amylase inhibitor activity of different Hungarian sour cherry varieties (*Prunus cerasus L.*)*. *Food Chem*, 2016. **194**: p. 222-9.
99. Wojdylo, A., et al., *Evaluation of sour cherry (*Prunus cerasus L.*) fruits for their polyphenol content, antioxidant properties, and nutritional components*. *J Agric Food Chem*, 2014. **62**(51): p. 12332-45.
100. Yilmaz, F.M., M. Karaaslan, and H. Vardin, *Optimization of extraction parameters on the isolation of phenolic compounds from sour cherry (*Prunus cerasus L.*) pomace*. *J Food Sci Technol*, 2015. **52**(5): p. 2851-9.
101. Bak, I., et al., *Isolation and analysis of bioactive constituents of sour cherry (*Prunus cerasus*) seed kernel: an emerging functional food*. *J Med Food*, 2010. **13**(4): p. 905-10.
102. Bak, I., et al., *Cardioprotective mechanisms of *Prunus cerasus* (sour cherry) seed extract against ischemia-reperfusion-induced damage in isolated rat hearts*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **291**(3): p. H1329-36.
103. Szabo, M.E., et al., *Heme oxygenase-1-related carbon monoxide and flavonoids in ischemic/reperfused rat retina*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004. **45**(10): p. 3727-32.
104. Tosaki, A. and D.K. Das, *The role of heme oxygenase signaling in various disorders*. *Mol Cell Biochem*, 2002. **232**(1-2): p. 149-57.
105. Czompa, A., et al., *Cardioprotection afforded by sour cherry seed kernel: the role of heme oxygenase-1*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014. **64**(5): p. 412-9.
106. Lekli, I., et al., *Protective mechanisms of resveratrol against ischemia-reperfusion-induced damage in hearts obtained from Zucker obese rats: the role of GLUT-4 and endothelin*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **294**(2): p. H859-66.
107. Grundy, S.M., *Monounsaturated fatty acids, plasma cholesterol, and coronary heart disease*. *Am J Clin Nutr*, 1987. **45**(5 Suppl): p. 1168-75.

108. Kris-Etherton, P.M. and J.A. Fleming, *Emerging nutrition science on fatty acids and cardiovascular disease: nutritionists' perspectives*. *Adv Nutr*, 2015. **6**(3): p. 326S-375S.
109. Fernandez, M.L. and S. Vega-Lopez, *Efficacy and safety of sitosterol in the management of blood cholesterol levels*. *Cardiovasc Drug Rev*, 2005. **23**(1): p. 57-70.
110. Hennig, B., M. Toborek, and C.J. McClain, *High-energy diets, fatty acids and endothelial cell function: implications for atherosclerosis*. *J Am Coll Nutr*, 2001. **20**(2 Suppl): p. 97-105.
111. Ip, W.T., et al., *Dietary omega-6 fatty acid replacement selectively impairs cardiac functional recovery after ischemia in female (but not male) rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016. **311**(3): p. H768-80.
112. Gilbert, K., et al., *Metabolites derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids are important for cardioprotection*. *Eur J Pharmacol*, 2015. **769**: p. 147-53.
113. Rajaram, S., K.M. Connell, and J. Sabate, *Effect of almond-enriched high-monounsaturated fat diet on selected markers of inflammation: a randomised, controlled, crossover study*. *Br J Nutr*, 2010. **103**(6): p. 907-12.
114. Pilkington, S.M., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids: photoprotective macronutrients*. *Exp Dermatol*, 2011. **20**(7): p. 537-43.
115. Csiki, Z., et al., *Orally delivered sour cherry seed extract (SCSE) affects cardiovascular and hematological parameters in humans*. *Phytother Res*, 2015. **29**(3): p. 444-9.
116. Magdolna, H., *Vizoldható karotinoidok és karotinoid dendrimerek előállításá*. 2012, Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet: Pécs.
117. Ziegler, R.G., S.T. Mayne, and C.A. Swanson, *Nutrition and lung cancer*. *Cancer Causes Control*, 1996. **7**(1): p. 157-77.
118. Caballero, B., *Guide to nutritional supplements*. 2009, Oxford: Elsevier.
119. Kopec, R.E., et al., *Avocado consumption enhances human postprandial provitamin A absorption and conversion from a novel high-beta-carotene tomato sauce and from carrots*. *J Nutr*, 2014. **144**(8): p. 1158-66.
120. Siems, W., et al., *Beta-carotene breakdown products may impair mitochondrial functions--potential side effects of high-dose beta-carotene supplementation*. *J Nutr Biochem*, 2005. **16**(7): p. 385-97.
121. von Lintig, J., *Provitamin A metabolism and functions in mammalian biology*. *Am J Clin Nutr*, 2012. **96**(5): p. 1234S-44S.

122. Hennekens, C.H., et al., *Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease*. N Engl J Med, 1996. **334**(18): p. 1145-9.
123. Siems, W., et al., *Beta-carotene degradation products - formation, toxicity and prevention of toxicity*. Forum Nutr, 2009. **61**: p. 75-86.
124. Kleinjans, J.C., et al., *In vitro investigations into the interaction of beta-carotene with DNA: evidence for the role of carbon-centered free radicals*. Carcinogenesis, 2004. **25**(7): p. 1249-56.
125. Lowe, G.M., et al., *The degradation of (all-E)-beta-carotene by cigarette smoke*. Free Radic Res, 2009. **43**(3): p. 280-6.
126. van Helden, Y.G., et al., *Beta-carotene metabolites enhance inflammation-induced oxidative DNA damage in lung epithelial cells*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(2): p. 299-304.
127. Palozza, P., et al., *Prooxidant effects of beta-carotene in cultured cells*. Mol Aspects Med, 2003. **24**(6): p. 353-62.
128. Paolini, M., et al., *Induction of cytochrome P450 enzymes and over-generation of oxygen radicals in beta-carotene supplemented rats*. Carcinogenesis, 2001. **22**(9): p. 1483-95.
129. Haines, D.D., et al., *Cardioprotective effects of the calcineurin inhibitor FK506 and the PAF receptor antagonist and free radical scavenger, EGb 761, in isolated ischemic/reperfused rat hearts*. J Cardiovasc Pharmacol, 2000. **35**(1): p. 37-44.
130. Haines, D.D., et al., *Summative interaction between astaxanthin, Ginkgo biloba extract (EGb761) and vitamin C in suppression of respiratory inflammation: a comparison with ibuprofen*. Phytother Res, 2011. **25**(1): p. 128-36.
131. Mahmoud, F.F., et al., *Sour cherry seed kernel extract increases heme oxygenase-1 expression and decreases representation of CD3+ TNF-alpha+ and CD3+IL-8+ subpopulations in peripheral blood leukocyte cultures from type 2 diabetes patients*. Phytother Res, 2013. **27**(5): p. 767-74.
132. Hafiz, T.A., et al., *The potential role of Punica granatum treatment on murine malaria-induced hepatic injury and oxidative stress*. Parasitol Res, 2016. **115**(4): p. 1427-33.
133. Shafik, N.M. and M.M. El Batsh, *Protective Effects of Combined Selenium and Punica granatum Treatment on Some Inflammatory and Oxidative Stress Markers in Arsenic-Induced Hepatotoxicity in Rats*. Biol Trace Elem Res, 2016. **169**(1): p. 121-8.

134. Ankita, P., B. Deepti, and M. Nilam, *Flavonoid rich fraction of Punica granatum improves early diabetic nephropathy by ameliorating proteinuria and disturbed glucose homeostasis in experimental animals*. Pharm Biol, 2015. **53**(1): p. 61-71.
135. Mahmoud, F., et al., *Sour cherry (Prunus cerasus) seed extract increases heme oxygenase-1 expression and decreases proinflammatory signaling in peripheral blood human leukocytes from rheumatoid arthritis patients*. Int Immunopharmacol, 2014. **20**(1): p. 188-96.
136. Namvar Vansofla, F., et al., *Impact of Prunus Cerasus on PGR and HAS2 in Cumulus Cells and Fertility Outcome*. Adv Pharm Bull, 2016. **6**(1): p. 65-9.
137. Sarada, S.K., et al., *Antioxidant effect of beta-carotene on hypoxia induced oxidative stress in male albino rats*. J Ethnopharmacol, 2002. **79**(2): p. 149-53.
138. Hagymasi, K., A. Egresi, and G. Lengyel, [*Antioxidants--antioxidative stress: facts and questions, 2015*]. Orv Hetil, 2015. **156**(47): p. 1884-7.
139. Wertz, K., et al., *Beta-carotene inhibits UVA-induced matrix metalloprotease 1 and 10 expression in keratinocytes by a singlet oxygen-dependent mechanism*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(5): p. 654-70.
140. Fito, M., et al., *Advances in Integrating Traditional and Omic Biomarkers When Analyzing the Effects of the Mediterranean Diet Intervention in Cardiovascular Prevention*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(9).
141. Zhan, G., et al., *Antitumor, Antioxidant, and Nitrite Scavenging Effects of Chinese Water Chestnut (Eleocharis dulcis) Peel Flavonoids*. J Food Sci, 2016.
142. Maheswaraiah, A., L.J. Rao, and K.A. Naidu, *Anti-platelet activity of water dispersible curcuminoids in rat platelets*. Phytother Res, 2015. **29**(3): p. 450-8.
143. Voss, K.A., et al., *An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and Fusarium moniliforme*. Environ Health Perspect, 2001. **109 Suppl 2**: p. 259-66.
144. Elsharawy, S., et al., *Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker for the prediction of worsening renal function in children hospitalized for acute heart failure*. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2016. **27**(1): p. 49-54.
145. Delanghe, J., et al., *Normal reference values for creatine, creatinine, and carnitine are lower in vegetarians*. Clin Chem, 1989. **35**(8): p. 1802-3.
146. Atasoy, N., et al., *A review of liver function tests during treatment with atypical antipsychotic drugs: a chart review study*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2007. **31**(6): p. 1255-60.

147. Grases, F., et al., *Effect of consuming a grape seed supplement with abundant phenolic compounds on the oxidative status of healthy human volunteers*. Nutr J, 2015. **14**: p. 94.
148. Cesarini, J.P., et al., *Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2003. **19**(4): p. 182-9.
149. Baccarin, T., et al., *Photoprotection by Punica granatum seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line*. J Photochem Photobiol B, 2015. **153**: p. 127-36.
150. Grether-Beck, S., et al., *Effective photoprotection of human skin against infrared A radiation by topically applied antioxidants: results from a vehicle controlled, double-blind, randomized study*. Photochem Photobiol, 2015. **91**(1): p. 248-50.
151. Lee, C.M., et al., *Review of animal models in carotenoid research*. J Nutr, 1999. **129**(12): p. 2271-7.
152. Schwingshackl, L., et al., *Dietary supplements and risk of cause-specific death, cardiovascular disease, and cancer: a protocol for a systematic review and network meta-analysis of primary prevention trials*. Syst Rev, 2015. **4**: p. 34.
153. Krinsky, N.I. and K.J. Yeum, *Carotenoid-radical interactions*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **305**(3): p. 754-60.
154. Haines, D.D., et al., *Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders*. Acta Physiol (Oxf), 2012. **204**(4): p. 487-501.
155. Stutz, H., N. Bresgen, and P.M. Eckl, *Analytical tools for the analysis of beta-carotene and its degradation products*. Free Radic Res, 2015. **49**(5): p. 650-80.
156. Alija, A.J., et al., *Cyto- and genotoxic potential of beta-carotene and cleavage products under oxidative stress*. Biofactors, 2005. **24**(1-4): p. 159-63.
157. Andersen, H.J., et al., *Ferrous-iron-induced oxidation in chicken liver slices as measured by hemichrome formation and thiobarbituric acid-reactive substances: effects of dietary vitamin E and beta-carotene*. Free Radic Biol Med, 1993. **15**(1): p. 37-48.



Nyilvántartási szám: DEENK/202/2016.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Csépanyi Evelin  
Neptun kód: MQSH1Y  
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10043462

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Csépanyi, E.**, Czompa, A., Haines, D. D., Lekli, I., Bakondi, E., Balla, G., Tósaki, Á., Bak, I.:  
Cardiovascular effects of low versus high-dose beta-carotene in a rat model.  
*Pharmacol. Res.* 100, 148-156, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.021>  
IF: 4.816
2. Bak, I., Czompa, A., **Csépanyi, E.**, Juhász, B., Kalantari, H., Najm, K., Aghel, N., Varga, B.,  
Haines, D. D., Tósaki, Á.: Evaluation of systemic and dermal toxicity and dermal  
photoprotection by sour cherry kernels.  
*Phytother. Res.* 25 (11), 1714-1720, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3580>  
IF: 2.086





---

**További közlemények**

3. Czompa, A., Gyöngyösi, A., Czeplédi, A., **Csépányi, E.**, Bak, I., Haines, D. D., Tósaki, Á., Lekli, I.:  
Cardioprotection afforded by sour cherry seed kernel: the role of heme oxygenase-1.  
*J. Cardiovasc. Pharmacol.* 64 (5), 412-419, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.000000000000132>  
IF: 2.135
4. Meyer, G., Czompa, A., Reboul, C., **Csépányi, E.**, Czeplédi, A., Bak, I., Balla, G., Balla, J., Tósaki, Á., Lekli, I.: The Cellular Autophagy Markers Beclin-1 and LC3B-II are Increased during Reperfusion in Fibrillated Mouse Hearts.  
*Curr. Pharm. Des.* 19 (39), 6912-6918, 2013.  
IF: 3.288
5. Gesztelyi, R., Kiss, Z. M., Wachal, Z., Juhász, B., Bombicz, M., **Csépányi, E.**, Pák, K., Zsuga, J., Papp, C., Galajda, Z., Branzaniuc, K., Pórszász, R., Szentmiklósi, J. A., Tósaki, Á.: The surmountable effect of FSCPX, an irreversible A1 adenosine receptor antagonist, on the negative inotropic action of A1 adenosine receptor full agonists in isolated guinea pig left atria.  
*Arch. Pharm. Res.* 36 (3), 293-305, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-013-0056-z>  
IF: 1.751

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,076**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 6,902**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.07.13.



## 9. Tárgyszavak

Iszkémia/reperfúzió

Izolált dolgozó szív

Meggy mag kivonat

Béta-karotin

Infarktusos terület

Antioxidáns/Prooxidáns

Ischemia/reperfusion

Isolated working heart

Sour cherry seed extract

Beta-carotene

Infarct size

Antioxidant/prooxidant

## 10. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Tósaki Árpádnak, hogy lehetővé tette számomra az általa vezetett Gyógyszerhatástani Tanszéken a kutatást, utam során mindvégig anyagi támogatásban részesített és bizalmat szavazott nekem.

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Habil. Bak Istvánnak a sok éven át tartó szakmai iránymutatását, ösztönzését és biztatását, melynek eredményeként doktori értekezésem megszülethetett.

Köszönettel tartozom közeli munkatársaimnak, Dr. Lekli Istvánnak és Dr. Czompa Attilának mindenért, ami hol apró ötletekből, iránymutatásokból hol pedig a gyakorlat során nyújtott segítségből állt; és nehéz időkben a lelki támogatásból is. Megragadom az alkalmat, hogy említést tegyek a többi velem dolgozó munkatársamról, akik szintén apró szerves részét képezték a mindennapi munkámnak és életemnek; gondolok itt Gyöngyösi Alexandrára, Dr. Gesztelyi Rudolfra, dr. Szőke Kittire, Czeglédi Andrásra, Zilinyi Ritára és a volt munkatársaimra is.

Külön köszönettel tartozom Berczi-Kun Enikőnek és Füzesi Tibornak akik a mindennapjaimat megkönnyítették az adminisztratív teendőim segítségével, melynek eredményeképpen több idő jutott egyéb feladataimra.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni az egész családomnak a belém vetett bizalmát, minek végén sikerült idáig eljutnom, bár rögös volt az út.

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg, valamint a Richter Gedeon Talentum Alapítvány, a Richter Gedeon Centenárium Alapítvány, OTKA K-104017, PD-11794, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045, TÁMOP-4.2.2-08/1-2008-0007, TÁMOP-4.2.6-15/1-2015-0001, DE Belső Kutatási Pályázat támogatásával valósult meg.

## **11. Függelék**

Az értekezés alapjául szolgáló cikkek