

**DEBRECENI EGYETEM**

**KERPÉLY KÁLMÁN NÖVÉNYTERMESZTÉSI- ÉS KERTÉSZETI  
TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Doktori iskola vezető:**

Prof. Dr. Nagy János az MTA doktora

**Témavezető:**

Dr. Remenyik Judit, PhD  
tudományos főmunkatárs

**MAGYARORSZÁGI MEGGYFAJTÁKBÓL IZOLÁLT ANTOCIANINOK,  
MINT TERMÉSZETES HUMÁN NYÁLAMILÁZ INHIBITOROK, SZEREPE A  
FOGSZUVASODÁS KIALAKULÁSÁNAK PREVENCIÓJÁBAN**

Készítette:  
**Homoki Judit Rita**  
doktorjelölt

Debrecen  
2020

**MAGYARORSZÁGI MEGGYFAJTÁKBÓL IZOLÁLT ANTOCIANINOK,  
MINT TERMÉSZETES HUMÁN NYÁLAMILÁZ INHIBITOROK, SZEREPE A  
FOGSZUVASODÁS KIALAKULÁSÁNAK PREVENCIÓJÁBAN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a növénytermesztési és kertészeti tudományok tudományágban készült

Írta: Homoki Judit Rita okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem **Kerpely Kálmán Doktori Iskolája**  
Növénytermesztési- és kertészeti tudományok programja keretében

Témavezető: Dr. Remenyik Judit, PhD Tudományos főmunkatárs

A doktori szigorlati bizottság:

|        | név                               | tud. fokozat    |
|--------|-----------------------------------|-----------------|
| elnök: | Dr. Sipos Péter PhD,              | egyetemi docens |
| tagok: | Stefanovitsné Dr. Bányai Éva DSc, | egyetemi tanár  |
|        | Dr. Szabó Zoltán DSc,             | egyetemi tanár  |

A doktori szigorlat időpontja: 2016. április 29.

Az értekezés bírálói:

| név   | tud. fokozat | aláírás |
|-------|--------------|---------|
| ..... | .....        | .....   |
| ..... | .....        | .....   |

A bírálóbizottság:

|         | név   | tud. fokozat | aláírás |
|---------|-------|--------------|---------|
| elnök:  | ..... | .....        | .....   |
| tagok:  | ..... | .....        | .....   |
|         | ..... | .....        | .....   |
| titkár: | ..... | .....        | .....   |

Az értekezés védésének időpontja: .....

|                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RÖVIDÍTÉSEK.....</b>                                                        | <b>7</b>  |
| <b>1. BEVEZETÉS .....</b>                                                      | <b>10</b> |
| <b>2. CÉLKITŰZÉS .....</b>                                                     | <b>12</b> |
| <b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>                                             | <b>13</b> |
| <b>3.1 A MEGGY JELLEMZÉSE.....</b>                                             | <b>13</b> |
| 3.1.1 Antocianinok bioszintézise .....                                         | 15        |
| 3.1.2 Antocianinok szerepe a növényekben.....                                  | 20        |
| 3.1.3 A melatonin bioszintézise .....                                          | 22        |
| 3.1.4 Melatonin szerepe a növényekben .....                                    | 24        |
| <b>3.2 AZ ANTOCIANINOK ÉLETTANI HATÁSA.....</b>                                | <b>25</b> |
| 3.2.1 Antioxidáns hatás.....                                                   | 25        |
| 3.2.2 Gyulladáscsökkentő hatás .....                                           | 27        |
| 3.2.3 Kardiovaszkuláris hatás .....                                            | 28        |
| 3.2.4 Zsír- és szénhidrát anyagcserére gyakorolt hatás.....                    | 30        |
| 3.2.5 Daganatos megbetegedésekre gyakorolt hatás.....                          | 32        |
| <b>3.3 AZ ANTOCIANINOK SZEREPE A SZÁJÜREGI EGÉSZSÉG<br/>MEGŐRZÉSÉBEN .....</b> | <b>33</b> |
| <b>3.4 A MELATONIN ÉLETTANI HATÁSA.....</b>                                    | <b>36</b> |
| <b>3.5 A MELATONIN SZEREPE A SZÁJÜREGI EGÉSZSÉG MEGŐRZÉSÉBEN<br/>.....</b>     | <b>39</b> |
| <b>3.6 <math>\alpha</math>-AMILÁZOK SZERKEZETE.....</b>                        | <b>41</b> |
| 3.6.1 Humán nyálamiláz (HSA).....                                              | 41        |
| <b>3.7 HUMÁN NYÁLAMILÁZ INHIBITOROK .....</b>                                  | <b>43</b> |
| 3.7.1 A nyálamiláz inhibitorok jelentősége .....                               | 43        |
| 3.7.2 Táplálékban előforduló természetes nyálamiláz inhibitorok .....          | 43        |
| 3.7.2.1 Flavonoidok, mint természetes inhibitorok.....                         | 43        |
| 3.7.2.2 Antocianinok, mint természetes inhibitorok .....                       | 45        |

|                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.8 FOGSZUVASODÁS KIALAKULÁSÁT MEGHATÁROZÓ TÉNYEZŐK ...</b>                  | <b>46</b> |
| 3.8.1 Fogszuvasodás-dental caries .....                                         | 46        |
| 3.8.2 A fogszuvasodás kialakulásának feltételei.....                            | 46        |
| 3.8.3 A dentális plakk kialakulásának folyamata.....                            | 47        |
| 3.8.4 A dentális plakk kapcsolata a fogszuvasodással .....                      | 50        |
| 3.8.5 A <i>Streptococcus mutans</i> szerepe a caries kialakulásában.....        | 51        |
| <b>3.9 A FOGSZUVASODÁS PREVENCIÓS LEHETŐSÉGEI .....</b>                         | <b>52</b> |
| 3.9.1 Fluoridok szerepe a prevencióban .....                                    | 52        |
| 3.9.2 Szájhigiéné szerepe a prevencióban.....                                   | 52        |
| 3.9.3 A barázdazárás szerepe a prevencióban.....                                | 53        |
| 3.9.4 Táplálkozás szerepe a prevencióban .....                                  | 53        |
| 3.9.4.1 A rágógumi szerepe a fogszuvasodás kialakulásának prevenciójában .....  | 53        |
| <b>4. ANYAG ÉS MÓDSZER .....</b>                                                | <b>57</b> |
| <b>4.1 MEGGYFAJTÁK SZÁRMAZÁSA .....</b>                                         | <b>57</b> |
| <b>4.2 FELHASZNÁLT VEGYSZEREK .....</b>                                         | <b>57</b> |
| 4.2.1 Standardok .....                                                          | 57        |
| 4.2.2 Vegyszerek az antioxidáns kapacitás méréshez.....                         | 57        |
| 4.2.3 Kinetikai mérésre használt vegyszerek .....                               | 58        |
| <b>4.3 AZ <i>IN VITRO</i> VIZSGÁLAT SORÁN ALKALMAZOTT MÉRÉSI MÓDSZEREK.....</b> | <b>58</b> |
| 4.3.1 Minta előkészítés szárazanyagtartalom mérésre.....                        | 58        |
| 4.3.2 Extrakciós eljárások és UHPLC analízis .....                              | 58        |
| 4.3.3 Antocianinok meghatározása pH differenciál módszerrel.....                | 60        |
| 4.3.4 Antioxidáns kapacitás mérése.....                                         | 60        |
| 4.3.5 MALDI-TOF MS.....                                                         | 61        |
| 4.3.6 Kinetikai mérések .....                                                   | 62        |
| <b>4.4 KLINIKAI VIZSGÁLATOK ELŐKÉSZÍTÉSE .....</b>                              | <b>62</b> |
| 4.4.1 Nyálminták gyűjtéséhez szükséges engedélyek.....                          | 62        |
| 4.4.2 Klinikai vizsgálatban résztvevők meghatározása .....                      | 70        |
| 4.4.3 Nyálminta gyűjtés menete.....                                             | 74        |
| <b>4.5 AZ KLINIKAI VIZSGÁLAT SORÁN ALKALMAZOTT MÓDSZEREK.....</b>               | <b>75</b> |
| 4.5.1 Meggy extraktum készítése.....                                            | 75        |

|                                                                                                                  |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.5.2 Rágógumi készítés meggy extraktummal és anélkül .....                                                      | 75         |
| 4.5.3 Rágógumi vizsgálata .....                                                                                  | 75         |
| 4.5.4 A nyálminták $\alpha$ -amilázaktivitásának mérése .....                                                    | 76         |
| 4.5.5 Mikrobiológiai mérések .....                                                                               | 77         |
| 4.5.6 Statisztikai analízis .....                                                                                | 77         |
| <b>5. SAJÁT VIZSGÁLATOK ÉS EREDMÉNYEK.....</b>                                                                   | <b>79</b>  |
| <b>5.1 A MEGGY ANTOCIANIN PROFILJA .....</b>                                                                     | <b>80</b>  |
| 5.1.1 Vizsgált meggyfajták szárazanyagtartalma .....                                                             | 80         |
| 5.1.2 Antocianin-tartalom meghatározása pH-differenciál módszerrel és SPE izolálással .....                      | 80         |
| 5.1.3 Magyarországi meggyfajták antocianin profiljának meghatározása UHPLC-vel .....                             | 83         |
| 5.1.4 A meggy fő komponenseinek azonosítása MALDI-TOF tömegspektrométerrel .....                                 | 86         |
| <b>5.2 ANTIOXIDÁNS KAPACITÁS VIZSGÁLATA.....</b>                                                                 | <b>87</b>  |
| 5.2.1 Meggyfajták antioxidáns kapacitásának vizsgálata .....                                                     | 88         |
| <b>5.3 A MEGGYKIVONATOK ÉS A FŐ ANTOCIANIN KOMPONENSEK<br/>INHIBICIÓS VIZSGÁLATA <i>IN VITRO</i>.....</b>        | <b>90</b>  |
| 5.3.1 $\alpha$ -Amiláz gátlás meghatározása .....                                                                | 90         |
| 5.3.2 Az antocianinok bekötődésének modellezése az $\alpha$ -amiláz enzim aktív centrumába .....                 | 94         |
| <b>5.4 A MEGGYKIVONAT-TARTALMÚ RÁGÓGUMI HATÁSÁNAK<br/>VIZSGÁLATA PILOT CLINICAL STUDY-BAN.....</b>               | <b>97</b>  |
| 5.4.1 A nyugalmi és inger nyál vizsgálata .....                                                                  | 97         |
| 5.4.2 A nyugalmi nyál aktivitása .....                                                                           | 98         |
| 5.4.3 A meggykivonatot tartalmazó rágógumi nyál amilázaktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata .....           | 99         |
| 5.4.4 Kérdőív értékelése I. ....                                                                                 | 102        |
| 5.4.5 A meggykivonatot tartalmazó rágógumi hatásának vizsgálata <i>Streptococcus mutans</i> egyedszámra<br>..... | 105        |
| 5.4.6 Kérdőív értékelése II. ....                                                                                | 108        |
| <b>5.5 A MEGGY MELATONIN KONCENTRÁCIÓJÁNAK MEGHATÁROZÁSA<br/>.....</b>                                           | <b>113</b> |
| <b>6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK .....</b>                                                                      | <b>115</b> |
| <b>7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>                                                                          | <b>116</b> |

|                                                       |            |
|-------------------------------------------------------|------------|
| <b>8. GYAKORLATBAN ALAKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK .....</b> | <b>117</b> |
| <b>9. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>                         | <b>118</b> |
| <b>10. SUMMARY .....</b>                              | <b>124</b> |
| <b>11. IRODALOM .....</b>                             | <b>130</b> |
| <b>12. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN .....</b> | <b>159</b> |
| <b>13. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....</b>                   | <b>162</b> |
| <b>14. MELLÉKLET .....</b>                            | <b>164</b> |
| <b>15. NYILATKOZAT .....</b>                          | <b>181</b> |

## RÖVIDÍTÉSEK

|                  |                                                                           |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 4CL              | 4-kumariol: KoA-ligáz                                                     |
| ‘A’              | ‘Újfehértói fürtös’ meggyfajta változata                                  |
| ABA              | Abcizinsav                                                                |
| ABC-transzporter | ATP-binding cassette transporters                                         |
| ACE              | Angiotenzin I konvertáló enzim                                            |
| ACL              | Zsíroldékony antioxidáns kapacitás                                        |
| ACO              | Acyl-coenzim A (CoA) oxidáz                                               |
| ACT              | Antocianin-aciltarnszferáz                                                |
| ACW              | Vízoldékony antioxidáns kapacitás                                         |
| AFMK             | N <sup>1</sup> -acetyl-N <sup>2</sup> -formyl-5-methoxy-kinuramin         |
| AMK              | N <sup>1</sup> -acetyl-5-methoxy-kinuramin                                |
| ANOVA            | varianciaanalízis                                                         |
| APX              | Aszkorbát-peroxidáz                                                       |
| Arg              | Arginin                                                                   |
| ASN              | Antocianin szintáz                                                        |
| Asp              | Aszparaginsav                                                             |
| ATP              | Adenozin-trifoszfát                                                       |
| BHA              | gumialap                                                                  |
| C4H              | Fahéjsav-4-hidroxiláz                                                     |
| CAT              | Kataláz                                                                   |
| CDK-1 és -2      | Ciklin dependens kináz-1 és -2                                            |
| CHD              | Coronary heart disease/Szív-és koszorúér betegség                         |
| CHI              | Kalkonizomeráz                                                            |
| CHS              | Kalkon szintáz                                                            |
| CNP              | 2-klór-4-nitrofenol                                                       |
| COX-1 és -2      | Cyclooxygenáz-1 és -2                                                     |
| CRP              | c-reaktív protein                                                         |
| CVD              | Cardiovascular disease/Kardiovaszkuláris betegségek                       |
| DFR              | Dihidroflavonol reduktáz                                                  |
| DHB              | 2,5-dihidroxi-benzoészav                                                  |
| DMF-S            | Maradandó fogakra vonatkozó romlott, hiányzó és tömött fogfelszínek száma |
| DMF-T            | Maradandó fogakra vonatkozó romlott, hiányzó és tömött fogak száma        |
| dmf-t            | Tejfogakra vonatkozó romlott, hiányzó és tömött fogak száma               |
| DS               | Bomló fogfelületek száma                                                  |
| EE               | entero-endokrin                                                           |
| EKG              | Elektrocardiográfia                                                       |
| eNOS             | Nitrogén-monoxid szintáz                                                  |
| EPS              | Extracelluláris poliszacharid                                             |

|                                     |                                                                                                                  |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ER                                  | Endoplazmatikus retikulum                                                                                        |
| ET                                  | Ellagitannin                                                                                                     |
| F3H                                 | Flavanon-3-hidroxiláz                                                                                            |
| GalG <sub>2</sub> -CNP              | 2-klór-4-nitrofenil-béta-D-galaktopiranozil-alpha-D-glükopiranozil-alpha-1,4-glükopiranozid                      |
| GIT                                 | Gasztrointesztinális traktus                                                                                     |
| Gln                                 | Glutamin                                                                                                         |
| Glu                                 | Glutaminsav                                                                                                      |
| GLUT-4                              | Glükóz transzporter-4                                                                                            |
| GPx                                 | Glutation-peroxidáz                                                                                              |
| GR                                  | Glutation reduktáz                                                                                               |
| GSH                                 | Redukált glutation                                                                                               |
| GSSG                                | Oxidált glutation                                                                                                |
| GST                                 | Glutation-S-transzferáz                                                                                          |
| GTF                                 | glükozil-transzferáz                                                                                             |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>       | Hidrogén-peroxid                                                                                                 |
| His                                 | Hisztidin                                                                                                        |
| HPA                                 | Humán pankreász amiláz                                                                                           |
| HPLC                                | Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia                                                                          |
| HSA                                 | Humán nyálamiláz                                                                                                 |
| HUVEC(s)                            | Humán köldökvéna endothél (sejt)                                                                                 |
| I                                   | Inhibitor koncentráció                                                                                           |
| IAA                                 | Indol-3-ecetsav                                                                                                  |
| IC <sub>50</sub>                    | 50%-os enzimgátláshoz szükséges inhibitor koncentráció                                                           |
| ICAM-1                              | Intracelluláris sejtadhéziós molekula-1                                                                          |
| IL                                  | Interleukin                                                                                                      |
| IL-6                                | Interleukin 6                                                                                                    |
| IL-8                                | Interleukin 8                                                                                                    |
| IRS1                                | Inzulin receptor fehérje 1                                                                                       |
| JNK                                 | c-JunNH2-terminál kináz                                                                                          |
| K <sub>EI</sub> és K <sub>ESI</sub> | Az inhibítort tartalmazó komplexek disszociációs konstansai                                                      |
| K <sub>M</sub>                      | Michaelis konstans. A maximális reakciósebesség 50%-ának eléréséhez szükséges szubsztrát koncentráció            |
| LDL                                 | Kis sűrűségű lipoprotein                                                                                         |
| Leu                                 | Leucin                                                                                                           |
| LPS                                 | Lipopoliszacharid                                                                                                |
| Lys                                 | Lizin                                                                                                            |
| MALDI-TOF                           | Mátrix segítette lézer diabszorpciós ionanalizátorral és repülési idő analizátorral rendelkező tömegspektrométer |
| MCP-1                               | Monocita kemotaktikus protein-1                                                                                  |
| MES                                 | Morfolinó-etán-szulfonsav                                                                                        |
| v <sub>0</sub>                      | kezdeti sebesség                                                                                                 |

|                               |                                                                       |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| NADPH                         | Nikotinamid-adenin- dinukleotid-foszfát                               |
| NADPH-oxidáz                  | Nikotinamid-adenin- dinukleotid-foszfát oxidáz                        |
| NIDDM                         | NonInzulín Dependens Diabetes Mellitus / II. Típusú Diabetes Mellitus |
| NO                            | Nitrogén-monoxid                                                      |
| O <sub>2</sub> •              | Szuperoxid gyök                                                       |
| O <sub>2</sub> <sup>2</sup> • | Peroxi gyök                                                           |
| OH•                           | Hidroxil gyök                                                         |
| OMT                           | O-metiltranszferáz                                                    |
| ONOO•                         | Peroxinitrit gyök                                                     |
| Oszteoklaszt                  | A csontszövet alapállományában fagocitózisra specializált sejtek      |
| PAL                           | Fenilalanin-ammónialiáz                                               |
| PCL                           | Fotokemilumineszcencián alapuló mérés                                 |
| PGG <sub>2</sub>              | Endoperoxid                                                           |
| PMN                           | Polymorfonukleáris -leukocita                                         |
| PPAR-alpha                    | Peroxiszóma proliferátor aktivált alpha receptor                      |
| PPAR-gamma                    | Peroxiszóma proliferátor aktivált gamma receptor                      |
| PPARs                         | Peroxiszóma proliferátor aktivált receptor                            |
| RNS                           | Reaktív nitrogén formák                                               |
| ROS                           | Reaktív oxigén formák                                                 |
| S                             | Szubsztrát koncentráció                                               |
| sAA                           | Nyál amilázaktivitás                                                  |
| Ser                           | Serin                                                                 |
| SOD                           | Szuperoxid dizmutáz                                                   |
| SPE                           | Szilárs fázisú extrakció                                              |
| SPSS                          | Statisztikai program                                                  |
| STZ                           | Streptozotocin                                                        |
| THAP                          | 2,3,6-trihidroxi-acetofenon                                           |
| TIM                           | Trióz-foszfát-izomeráz                                                |
| TNF-alpha                     | Tumor nekrozis faktor alpha                                           |
| Trp                           | Triptofán                                                             |
| Tyr                           | Tirozin                                                               |
| UFGT                          | Flavonoid-3-O glükózil-transzferáz                                    |
| UHPLC                         | Ultranagy hatékonyságú folyadékkromatográfia                          |
| UQ                            | Ubiquinon                                                             |
| VCAM-1                        | Vasculáris sejtadhéziós molekula-1                                    |
| V <sub>max</sub>              | Limitált maximális sebesség                                           |
| ‘VN1’                         | ‘Bosnyák’ fajtakörhöz tartozó fajta.                                  |
| WHO                           | Egészségügyi világszervezet                                           |

## 1. BEVEZETÉS

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 1969-ben mutatta be az első globális térképet, amely a 12 évesek cariológiai státuszra vonatkozó dmf (d=decayed-szuvas, f=filled-tömött, m=missing-hiányzó fogak) számot tartalmazta. Ezen eredmények azt igazolták, hogy az iparosodott országokban nagyfokú a fogszuvasodás prevalenciája, míg a fejlődő országokban a caries előfordulási gyakorisága kisebb értéket mutatott. Néhány évvel ezelőtt a WHO kifejlesztette a szájbetegség felügyeleti rendszert, különösen a gyermekek fogszuvasodásával kapcsolatosan. A jelentések szerint Európában a 6 éves gyermekeknek 20-90% -nak van szuvas foga, és a felnőttek közel 100% -a tapasztalta a betegséget. A fogszuvasodás egy, a fogak kemény szövetének lokalizált pusztulásával járó multifaktoriális, civilizációs népbetegség, melyet a táplálékban előforduló szénhidrátok bakteriális fermentációja során kialakuló savas melléktermékek okoznak. Az elmúlt évtizedben a gyógynövényekből előállított gyógyhatású készítmények iránti érdeklődés jelentősen megnőtt. Jól dokumentált, hogy egyes gyógynövények és a természetes vegyületek jelentős antibakteriális hatást fejtenek ki különböző mikroorganizmusok ellen, beleértve a cariogén és periodontális kórokozókat is. Ezek a természetes fitokemikáliák hatékony alternatívákat kínálhatnak az antibiotikumok helyett, és ígéretes megközelítést jelentenek a fogszuvasodás és egyéb szájüregi fertőzések megelőzésére és kezelésére. Számos irodalom foglalkozik a meggy gyümölcs biológiailag aktív komponenseinek megismerésével. Ezen közleményekből ismerjük az antocianinok szerkezetét, mely igazolja a szabadgyökök eliminálásában betöltött szerepüket. A szerkezet megismeréséből következik, hogy ezen antocianin struktúrák farmakológiai szempontból rendkívül aktív molekulák. Nagyszámú irodalom arról számol be, hogy az antocianinok hatással vannak a cardiovascularis betegségek és a II-típusú diabetes mellitus kialakulásában kulcsfontosságú szerepet játszó enzimek aktivitására. Ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a magyarországi meggyfajtákban felhalmozódó antocianinok humán nyál amilázaktivitásra gyakorolt hatását, valamint, hogy az antocianinok milyen hatást gyakorolhatnak a szájüregben megtalálható *Streptococcus mutans* baktérium fajra és ezzel meghatározni az antocianinok szerepét a fogszuvasodás prevenciójában.

Napjainkban a melatonin jótékony hatását bemutató tanulmányok nagy számban jelennek meg. Részletesen beszámolnak az endogén és exogén eredetű melatonin szájüregi egészségre gyakorolt hatásáról, mely elsősorban a melatonin gyulladásgátló és antioxidáns hatásának köszönhető. Az élelmiszerekben előforduló melatoninnak szerepe lehet a szájüregi egészség megőrzésében. Megvizsgáltuk a magyarországi meggyfajták melatonin tartalmát.

## 2. CÉLKITŰZÉS

Célunk volt, hogy tanulmányozzuk a magyarországi meggyfajtákra jellemző antocianin komponensek inhibíciós aktivitását humán nyálamilázon:

- A meggy antocianin profiljának kvantitatív és kvalitatív meghatározása UHPLC-módszerrel.
- A meggy antocianinok és a meggy extraktum, *in vitro* kinetikai vizsgálata humán nyálamilázon.

További célunk volt, hogy pilot study-ban megvizsgáljuk az antocianinban dús, meggykivonat inhibíciós aktivitását humán nyálamilázon:

- Olyan Antocianinban dús meggy extraktum előállítása, melyben a biológiailag aktív molekulák megőrzik hatásukat.
- Olyan mintagyűjtési, valamint mérési protokoll kidolgozása, ahol a kontroll és kezelt csoportok hatásvizsgálati eredményei reprezentálják a három korcsoportra jellemző hatásokat.
- Az antocianint tartalmazó rágógumi humán nyál amilázaktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálta, valamint az antocianint tartalmazó rágógumi hatására kiürülő *Streptococcus mutans* egyedszám változásának leírása, nőknél és férfiaknál, többféle korcsoportú és eltérő életmódú, különböző szájhigiénével rendelkező önkénteseknél.
- Extrakciós eljárás kidolgozása a melatonin detektálásához, továbbá a meggy melatonin koncentrációjának meghatározása HPLC-módszerrel.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1 A MEGGY JELLEMZÉSE

A meggy (*Prunus cerasus* L.) rendszertanilag a *Rosaceae* család, *Prunoideae* alcsalád, valamint a *Prunus* nemzetség része. A meggy egy hibrid faj, melyet a cseresznye (*Prunus avium* L.) és a cseplesz meggy kereszteződésével alakították ki (Oldén és Nybom, 1968).

Magyarországon az egyik legnagyobb mennyiségben termesztett gyümölcs. Hazánkban a meggytermesztésnek évszázados múltja van. Magyarország földrajzi, éghajlati adottságainak és a hazai évtizedes nemesítő munkának köszönhetően a világon egyedülálló fajtaszortimenttel, valamint kiemelkedő beltartalmi paraméterekkel rendelkező fajták jöttek létre.

A hazai nemesítőknek (Maliga Pál, Brózik Sándor, Pethő Ferenc és a rezisztencia biológia fontosságának felismerésében a világon élenjáró, progresszív gondolkodású Apostol János), valamint az ország keleti részén megindult tájszelekciós munkáknak köszönhetően, a magyar piacokon a vásárlóknak május végétől július végéig lehetősége van friss, kedvező sav/cukor arányú és bioaktív komponensekben gazdag meggy gyümölcs fogyasztására.

Bizonyos fajták stabil pozíciót vívtak ki maguknak a nemzetközi piacon is. Michigan államban két magyar fajtát vontak be termesztésbe: a tájszelekciós munkák eredményeként állami elismerést kapott ‘Újfehértói fürtös’, mely az USA-ban “Balaton” néven vált ismertté és kb. 400 hektáros ültetvényt jegyeznek, valamint a keresztezéssel történő nemesítés során ismertté vált “Érdi bőtermő”, mely az USA-ban “Danube” néven vált ismertté és kb. 100 hektáros ültetvényt tartanak számon (Nyéki és mts., 2005).

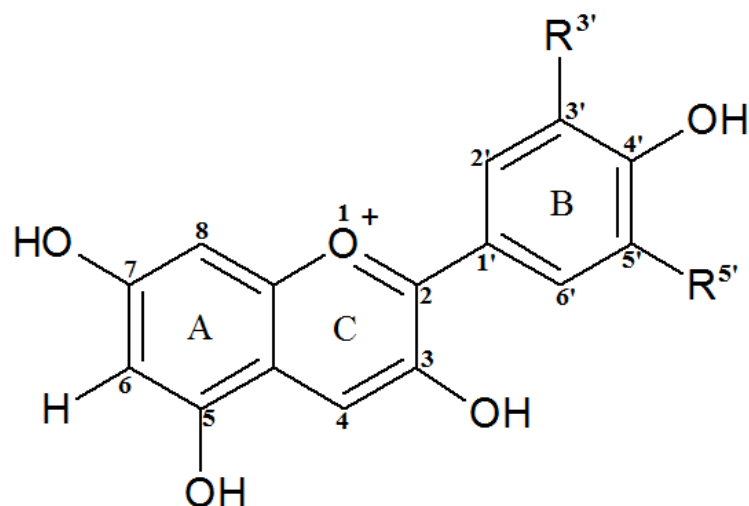
A meggyben az érés során elsődleges és másodlagos metabolitok halmozódnak fel melyek szerepe kitüntetett a növényi védekezés rendszerében.

Az irodalomból ismert a meggy fenol-karboxil savtartalma, e csoportba tartoznak a hidroxí-fahéjsav, a klorogénsav, a neoklorogénsav és a p-kumaroil-kinasav melyek mind nagy mennyiségben fordulnak elő a meggyben (Chaovanalikit és Wrolstad, 2004; Goncalves és mts., 2004). Számos tanulmány beszámolt a meggy flavanol típusú vegyületeiről, mint például a katechin, epikatechin, gallokathechin, epigallokatechinek és ezek származékairól (Piccolella és mts., 2008; Czyzowska és Pogorzelski, 2004).

Tartalmaznak tanninokat is. Kevésbé ismert, de a melatonin (N-acetil-5-metoxi-triptamin) egy másik fontos vegyület, amelyet azonosítottak a 'Balaton' és a 'Montmorency' meggyfajtákban (Burkhardt és mts., 2001; Reiter és Tan, 2002). Ezen kívül a meggyben azonosítottak flavonoid-glikozidokat is, melyek más ehető bogyós gyümölcsben is gyakoriak. Ezek közé tartoznak a kvercetin-3-glükózil-rutinozid, kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-glükozid, kaempferol-3-glükozid, kaempferol-3-rutinozid és izoramnetin-3-rutinozid (Bonerz és mts., 2007; Kirakosyan és mts., 2009; Li és mts., 2008; Piccolella és mts., 2008).

A flavonoidok csoportjába tartoznak az antocianinok. Az antocianinok fő egysége az antocianidin aglikon, a difenilpropán C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> alapváz (A, C, B gyűrű). A két benzolgyűrű (A és B) egy oxigénatomot tartalmazó heterociklusos pirán vagy pirongyűrű (C) révén kötődik (Konczak és Zhang, 2004). Az antocianidinek glikozilált formái az antocianinok, vízben jobban oldódnak és szerkezetük stabilabb, mint az antocianidineknek (Timberlake és Bridle, 1976). Az antocianinokra jellemző cukor egységek a következők lehetnek: glükóz, galaktóz, ramnóz, arabinóz, xilóz, valamint a diszacharidok közül a rutinóz, szoforóz (De Ancos és mts., 1999; Kahkönen és mts., 2003). Számos esetben a cukor rész a kalkonváz C gyűrűjének 3-, 5-, vagy a 7-hidroxilcsoportjához kapcsolódik (Brouillard, 1982).

A növényvilágban hat antocianidin szintetizálódik: cianidin, delfinidin, peonidin, pelargonidin, a petunidin és a malvidin. Az antocianidinek szerkezetét az 1. ábrán látható. A cianidin, delfinidin, és a pelargonidin a levelek színeinek 80%-át, a gyümölcsök színeinek 69%-át, míg a virágok színeinek 50%-át adják (Kong és mts., 2003).



|              | R <sup>3'</sup>  | R <sup>5'</sup>  |
|--------------|------------------|------------------|
| Cianidin     | OH               | H                |
| Delphinidin  | OH               | OH               |
| Malvidin     | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> |
| Pelargonidin | H                | H                |
| Peonidin     | OCH <sub>3</sub> | H                |
| Petunidin    | OH               | OCH <sub>3</sub> |

1. ábra: Az antocianidin szerkezet

A piros bogyósokban a dominánsan előforduló antocianinok a cianidin- és pelargonidin-glikozidok (Bridle and Garcia-Viguera, 1997).

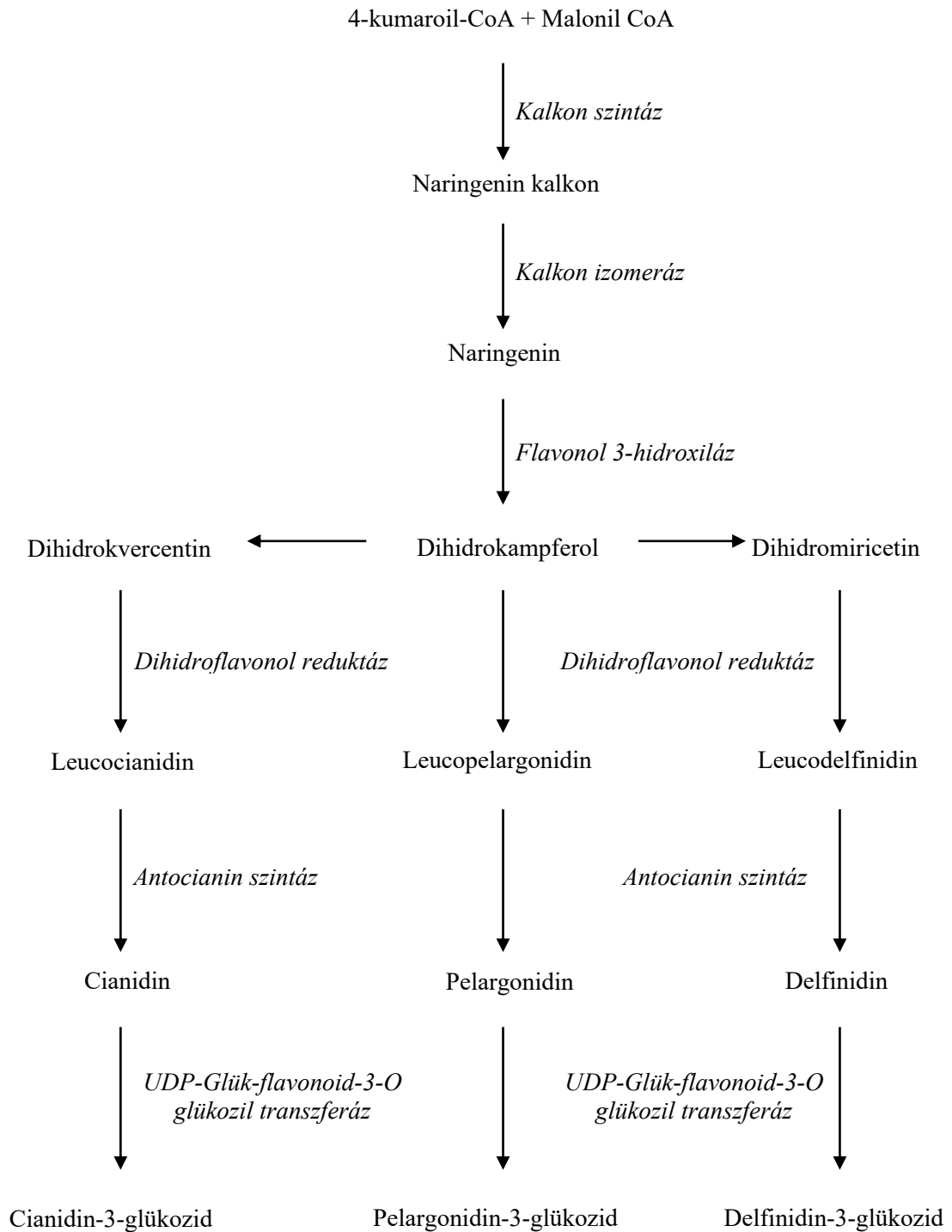
Wang és munkatársai állapították meg, hogy a meggy (*Prunus cerasus* L.) jelentős mennyiségű antocianint tartalmaz. A meggyben előforduló fő antocianin komponensek a cianidin-3-glükózid, cianidin-3-rutinozid, cianidin-3-glükozil-rutinozid, ezen kívül azonosították: a cianidin-3-soporozidot, a pelargonidin-3-glükózidot, a piperonil-3-rutinozidot, a cianidin-3-arabinozil-rutinozidot és a malvidin-3,5-diglükózidot (Wang és mts., 1997; Blando és mts., 2004; Piccolella és mts., 2008).

### 3.1.1 Antocianinok bioszintézise

A szekunder metabolitok közül az antocianinok bioszintézis útvonalát szélesebb körben vizsgálták. Így a szintézisben szerepet játszó enzimek és gének jól ismertek.

L-fenilalaninból a fenilalanin-ammóniáláz (PAL) nevű enzim hatására fahéjsav jön létre. A növényeknél a PAL kitüntetett szerepű enzim, amely katalizálja a polifenol vegyületek kialakulásának kezdeti lépéseit, és főként védelmi mechanizmusokban vesz részt (Tanaka és mts., 1989). Kialakul a 4-kumariol-KoA a fahéjsav-4-hidroxiláz (C4H) és 4-kumariol:

KoA-ligáz (4CL) enzimek katalízise során, miközben lignin, stilbeninek, amidok, benzoésavak és észterek keletkeztek bizonyos fajokban. Míg a lignin strukturális támogatásként működik, addig a stilbenek segítenek a biotikus és abiotikus stressz elleni védekezésben. A 2. ábra részletezi az antocianin szintézis útvonal lépéseit, ahol három malonil-KoA és egy 4-kumariol-KoA molekula reakciójából a kalkon szintáz (CHS, Kreuzaler és mts., 1975) katalizálta reakció során kialakul a kalkon, melyet a kalkonizomeráz (CHI) naringeninné alakít. A naringenin kalkon nemcsak az antocianinok vagy proantocianidinek, hanem más fenolos vegyületek szintéziséhez is fontos molekula. A flavanon-3-hidroxiláz (F3H) katalizálta folyamatban kialakul a dihidrokampferol, a másik két termék a dihidrokvercetin a flavanon-3'-hidroxiláz, illetve a dihidromiricetin a flavanon-3',5'-hidroxiláz katalízise során jön létre. Ezt követően a dihidroflavonol 4-reduktáz katalizálta (DFR), (Heller és mts., 1985; Reddy és mts., 1987) szintézis során keletkezik a leukopelargonidin, leukocianidin és a lekedelphinidin, és végül az antocianidin szintáz (ANS) által katalizált folyamat eredményeként különböző antocianidinek alakulnak ki, köztük a pelargonidin, cianidin, delfinidin malvidin, peonidin és a petunidin.



2. ábra: Antocianinok bioszintézis útvonala

Az ANS hatására kialakult színes antocianidin vegyületek azonnal módosulnak glükózilezéssel, melyet a flavonoid glükoziltranszferáz (UFGT) katalizál, metilezéssel, melyet a *O*-metiltranszferáz (OMT) katalizál, és acilezéssel, melyet az antocianin-aciltranszferáz (ACT) katalizál (Ford és mts., 1998; Springob és mts., 2003), annak

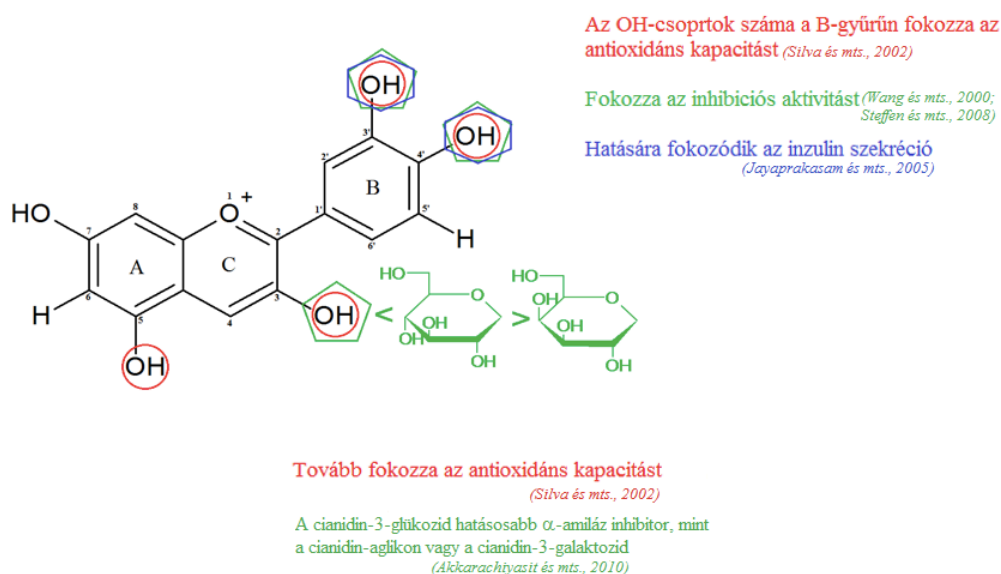
érdekében, hogy ezen vegyületek a stabilitásukat megőrizték. Az antocianinok bioszintézisben résztvevő enzimek az endoplazmatikus retikulum (ER) felszínén vagy a citoplazmában vannak. A keletkezett antocianinok vakuólumokban halmozódnak fel (Saslowsky és mts., 2001; Chen és mts., 2006; Barceló és mts., 1994). Az antocianinok szállításában döntő szerepet van az intracelluláris transzport folyamatoknak.

Ez megvalósulhat a glutathion-S-transzferáz (GST) konjugációja révén, amikor egy flavonoid-GST komplex alakulhat ki. A vakuólum membránjához kötött ABC-transzporterekkel (ATP-binding cassette transporters) (Marrs és mts., 1995) jutnak be a flavonoidok a vakuólumba. Egy másik lehetséges mód, hogy a flavonoid intermedierek transzporterek segítségével bejutnak az ER-be és a Golgi apparátuson keresztül vezikulákba zárva kerülnek a citoszolba, ahol endocitózissal szintén a vakuólumokba jutnak (Grotewold, 2001). Ezen kívül fitohormonok is befolyásolhatják az antocianin akkumulációt. Az abcizinsav (ABA) növelte az antocianin tartalmat a szőlőhájban, azáltal, hogy *Chs*, *Chi*, *Dfr* és *Ufgt* gének expresszióját növelte (Jeong és mts., 2004; Ban és mts., 2003). Az etilén, amely szintén a gyümölcsök érési folyamatát elősegítő hormon, fokozza a *Chs*, *F3h*, *Ans*, *Ufgt* expresszióját (El-Kereamy és mts., 2003). A jázminsav és azzal analóg vegyületek esetében *Chs* és a *Ufgt* gének expressziójának fokozódását igazolták, ezáltal az antocianin bioszintézisére is hatással van (Belhadj és mts., 2008).

Ezen kívül endogén és exogén kémiai tényezők szabályozhatják az antocianin bioszintézisét. Ezidáig szőlőben sikerült igazolni, hogy az antocianinok általában egy héttel később halmozódnak fel, mint a cukortartalom. A szőlőhájban keletkező cukrok szabályozó szerepet játszanak az antocianinok szintézisében, míg mások szerint a cukrok csak az antocianin képződés szubsztrátjaként fontosak (González-SanJosé és Diez., 1992). A cukrok fokozzák az *F3h* gén expresszióját és az antocianinok felhalmozódását, ezen eredmények alátámasztják azt a korábbi feltételezést, hogy a cukrok szerepet játszanak az antocianin szintézisében (Zheng és mts., 2009). Bizonyos toxinok pl: *Eutypa lata* toxinja drámai módon csökkenti az *Ufgt* gén expresszióját és gátolja az antocianinok felhalmozódását (Afifi és mts., 2003). Meghatározóak lehetnek még az antocianinok bioszintézisében az állandóan változó környezeti feltételek is. Vizsgálatokkal igazolták, hogy a gyümölcs-zóna levél eltávolításával a megnövekedett napfény-expozíció csökkentette a *Chs* és *F3s* expresszióját, így az antocianin felhalmozódását is a szőlő bogyóban (Jeong és mts., 2004; Chorti és mts., 2010). Az UV sugárzás fokozhatja az antocianin bioszintézisben részt vevő *Dfr* és *Ans* gének expresszióját, és ezáltal az antocianin felhalmozódását eredményezi (Park és mts., 2007). Általában az alacsony

hőmérséklet, mint például a 25 °C, kedvező az antocianin bioszintézisre, míg a magas hőmérséklet, például 35 °C, az antocianin bomláshoz és az antocianin felhalmozódás gátlásához vezethet. A szőlőben a magas éjszakai hőmérséklet a *Chs*, *F3h*, *Dfr*, *Ans* és *Ufgt* gén expresszióját gátolja az érés korai szakaszában, drasztikusan csökkenti az UFGT enzim aktivitását, ami az antocianinok gyenge termelését eredményezi (Mori és mts., 2005; Yamane és mts., 2006). A víz a harmadik fontos környezeti tényező, ami befolyásolhatja az antocianin bioszintézist. Az érés során, vízhiányos körülmények között, az antocianin bioszintézis nagymértékben stimulálható, ami fokozott antocianin felhalmozódást eredményez. A vízhiány az általános bioszintetikus gének mellett - például a *Chs*, az *F3h* és az *Ufgt* esetében - a B-gyűrű módosításával kapcsolatos géneket, beleértve az *F3'5'h* és az *Omt* expresszióját is stimulálja az érés során (Castellarin és mts., 2007).

Az antocianinokra jellemző kémiai szerkezet lehetővé teszi, hogy direkt hatásként eliminálják a reaktív oxigén formákat, és ezen képességük meghatározza farmakológiai aktivitásukat is. Az antocianinok antioxidáns aktivitását a B-gyűrű határozza meg, melynek 3' és 4' pozíciójában OH-csoport található. Magas antioxidáns aktivitást eredményez a 3-as pozícióhoz kapcsolódó OH-csoport. Ezen kívül meghatározó még az 5-ös pozícióban lévő OH-csoport is (Silva és mts., 2002). A 3. ábra összefoglalja az antocianinok szerkezetéből adódó élettani hatásokat.



3. ábra: Antocianinok hatása

Wang és mts arról számolt be, hogy a 'Balaton' hatszor több antocianint tartalmaz, mint a 'Montmorency' fajta. Ezen fajták fő komponensei: cianidin-3-glükózilrutinozid, cianidin-3-rutinozid, valamint a cianidin-3-glükózid (Wang és mts., 1997).

### **3.1.2 Antocianinok szerepe a növényekben**

Az antocianinok megvédik a fotoszintetikus apparátust (antenna pigmentek, reakció központok, kiegészítő fehérjék) az erős fény közvetlen hatásaitól (Wheldale, 1916), mert csökkentik a fotoinhibíciót (Steyn és mts., 2002; Gould és Lister 2005). A fiatal, fejlődő levelekben jelentős mértékben szintetizálódnak az antocianin pigmentek (Cai és mts., 2005), mert a fejlődő levelekben levő kloroplasztok különösen érzékenyek a közvetlen fény stressz hatására (Pettigrew és Vaughn 1998; Choinski és mts., 2003). Hughes és munkatársai igazolták az antocianinok fotoprotektív szerepét a fejlődő levelekben (2007). Az antocianinok bioszintézise a levélfejlődés korai szakaszára jellemző, és a teljesen differenciálódott levélszövet kialakulásáig tart. Számos növényfajnál sikerült igazolni, hogy a UV-expozíció aktiválja az antocianinok és más flavonoidok bioszintézisét (Mendez és mts., 1999; Singh és mts., 1999). Az antocianinok növényi fiziológiában beöltött szerepe sok esetben antioxidáns enzimek működésével is leírható, mert az antocianinokhoz hasonlóan a szuperoxid-dizmutáz (SOD) és aszkorbát-peroxidáz (APX) enzimek a kloroplasztokban csökkentik a fotoinhibíciót és a foto-oxidációt (Asada, 1999, 2000; Rizhsky és mts. 2003), bizonyos körülmények között azonban ezek az enzimek inaktívak lehetnek. Az erős fény és az alacsony hőmérséklet együtt, csökkenti az APX hatékonyságát, ami H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> felhalmozódásához vezet, így gátolva az APX, SOD és a kataláz (CAT) működését (Jahnke és mts., 1991; Wise, 1995; Casano és mts., 1997; Asada, 1999). Ahhoz, hogy ezen enzimek megfelelően működjenek, az antioxidáns enzimeket védeni kell a szabadgyökök támadásától. Számos tanulmány foglalkozott azokkal a körülményekkel, melyek inaktíválják a korábban említett enzimek aktivitását, de ugyanakkor stimulálják az antocianinok képződését a növényi szövetekben. Az antocianinok megakadályozzák ezen antioxidáns enzimek inaktiválását azáltal, hogy a korlátozzák a fotoszintetikus apparátushoz jutó fény mennyiségét, így mérséklődik a reaktív oxigén formák termelése. Ezáltal az antocianin pigmentek szintéziséhez történő egyszeri befektetéssel a növények elérhetik a növényi stresszválaszok ezen központi elemeinek hosszú távú védelmét. Valóban, a növények antioxidáns enzimaktivitás fenntartására vagy annak fokozására való képessége kulcsfontosságú tényezője lehet a növényi szövetek környezeti stresszre történő akklimatizálásának (Bowler és mts., 1992;

Anderson és mts., 1995; Pinhero és mts., 1997; Scebba és mts., 1999; Kuk és mts., 2003). Végül, az antocianinok kölcsönhatásba léphetnek másodlagos hírvivő molekulákkal. Érdekes az antocianinok és a szacharóz kölcsönhatása. Az antocianin bioszintetikus útját a szacharóz erősen szabályozza olyan növényekben, mint a retek (*Raphanus sativus*), és az angol borostyán (*Hedera hélix*) (Murray és Hackett, 1991; Hara és mts., 2003; Solfanelli és mts., 2006). Az oldható cukrok, különösen a szacharóz, a glükóz és a fruktóz, központi szerepet játszanak a növényfejlődés, a stresszválaszok és a génexpresszió szabályozásában (Gibson, 2005). A cukor felhalmozódását a különböző stresszhatásokkal szembeni tolerancia javította, beleértve az aszályt, a sótartalmat, a magas fényt, a hideget és a herbicideket (Roitsch, 1999; Couée és mts. 2006).

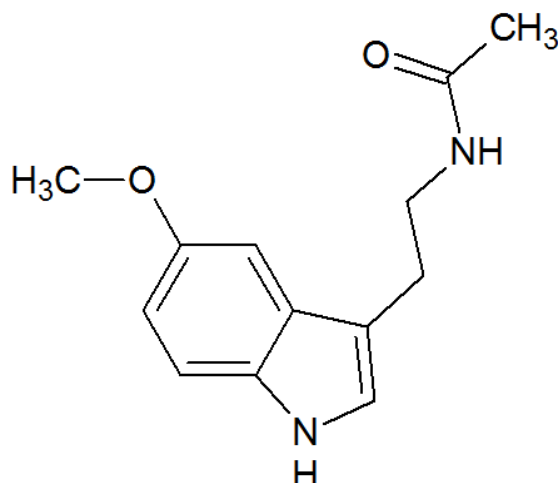
Az antocianinok fontos szerepet játszanak a növény és rovar populációk közötti kölcsönhatások folyamatában, például a herbivorok elriasztásában. Ennek egyik formája az aposematizmus, amikor a szembetűnő színezék a herbivorok figyelmeztetésére vagy elriasztására szolgál, például mérgező gyümölcsökkel, magokkal (Cook és mts., 1971; Harborne, 1982; Williamson, 1982), virágokkal (Hinton, 1973) és tövisekkel (Lev-Yadun, 2001, 2003a, 2003b, 2006). A hangya mimikrit több növény családban is megfigyelték. A mimikri a növény epidermiszén látható, sűrű, sötét színű, általában 2–10 mm hosszú folt. Ezek a jelölések hasonlítanak a hangyák méretéhez, alakjához és a térbeli hatásuk a hangyák oszlopaihoz hasonlít. A *Pisum fulvum* esetében megfigyelték az éretlen hüvely felületén felhalmozódó antocianinokat, amely gyakran hasonlít az aposematikus mérgező hernyókra (Lev-Yadun és Inbar, 2002). A magvak álcázása a talaj (Saracino és mts., 1997, 2004), a fiatal csemeték/magoncok elrejtése avar színének megfelelően történik, melyet a klorofill és az antocianin színkeveréke eredményez (Givnish, 1990). Egy másik közelmúltbeli hipotézis szerint a vörös és sárga pigmentek megjelenése a vegetatív és a reproduktív hajtásokban, megakadályozzák a gerinctelen herbivorok álcázását (Lev-Yadun és mts., 2004; Lev-Yadun, 2006). Így a gerinctelenek ki vannak téve a predátorok támadásának. Az antocianinok szerepet játszanak abban is, hogy a herbivorokat a fiatal, színes levelekre terelik, megvédve ezáltal a költségesebb idősebb leveleket (Lüttge, 1997). Ősszel a vörös levelek jelzést jelentenek a rovarok számára, hogy a fák jól védve vannak (Archetti, 2000; Hamilton és Brown, 2001; Schaefer és Rolshausen, 2006). Archetti és mts. (2000) szerint a vörös lombzat figyelmeztető jel a parazita rovarok számára, hogy hol nem helyezhetik el tojásaikat. Így az őszi lombzat a rovarok és a fák közötti koevolúcióból eredő adaptív jelenségnek tekinthető.

Másrészről a növény fiziológusok kimutatták, hogy az antocianinok egyedülállóak az öregedő lombzat számára, mivel az antocianinok javítják az őszi levelek nitrogénfelvételének sebességét (Hoch és mts., 2001, 2003.). Természetesen a vegetatív szervekben az antocianin bioszintézisének kialakulásához vezető szelektív nyomásoktól függetlenül, ezeknek a pigmenteknek a védekező és fiziológiai funkciói egyidejűleg működhetnek a növényekben.

### **3.1.3 A melatonin bioszintézise**

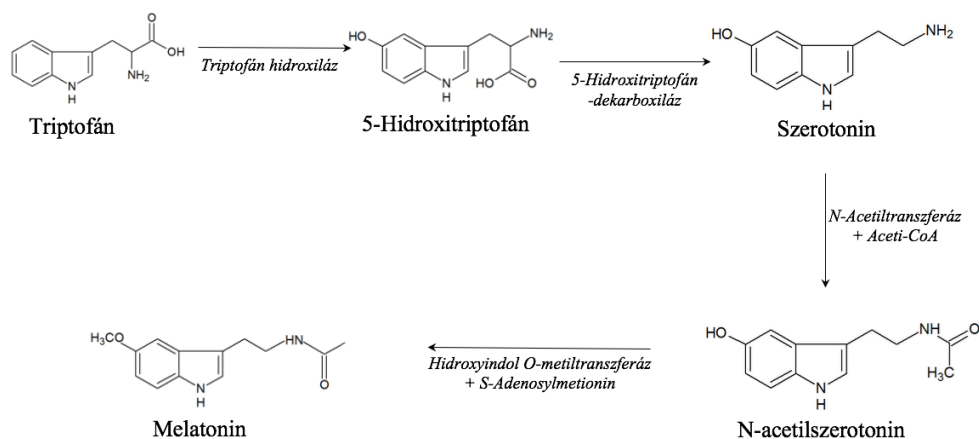
A magyarországi meggyfajtákból sikerült izolálni egy másik antioxidáns hatású molekulát, a melatonint, mely napjainkban ismét a tudományos világ érdeklődésének középpontjába került. Az elmúlt időszakban számos tanulmány foglalkozik a melatonin élettani hatásaival és klinikai vizsgálatával. A melatonin az emberi szervezetben a tobozmirigyben (glandula pinealis) termelődő hormon, mely a diencephalon (köztiagy), és mesencephalon határán annak felső ikertestei között fekvő endokrin mirigy (Szentágothai-Réthy, 1997). A melatonin szerkezete a 4. ábrán látható. A molekulát csak 1958-ban azonosították (Lerner és mts., 1958., Lerner és mts., 1959). 1995-ig a tudományos világ a melatonint egy, kizárólag csak a gerincesekben megtalálható hormonnak tartotta számon, melynek feladata szezonális- és a cirkadián ritmus szabályozása. A közelmúltban ezt a hormonhatású vegyületet azonosították hajtásos növényekben, Insectaban, Nematodaban, gombákban (Tan és mts., 2007; Stehle és mts., 2011; Migliori és mts., 2012). A 90-es évek közepén a melatonint sikerült azonosítani a fotoszintetizáló prokariótákból is (Manchester és mts., 1995). Ez azt jelenti, hogy a 2,5 milliárd évvel ezelőtt azonos formában megjelenő melatonin molekula szintézis útvonala erősen konzerválódott az evolúció során. A törzsfejlődés során akkor alakulhatott ki, amikor az egysejtű élőlények megkezdték az átmenetet az anaerob biokémiai folyamatokról az aerob biokémiai folyamatokra. A melatonin primer funkciója, hogy antioxidánsként szolgáljon, tehát az oxigén jelenlétében lejátszódó biokémiai folyamatok során keletkezett szabadgyökök eltávolításáért felelős molekula (Tan és mts., 2010; Hardeland és mts., 2012; Blask és mts. 2011; Motilva és mts., 2011).

A melatonin rendelkezik egy poláros és egy apoláros résszel, ami lehetővé teszi, hogy a melatonin transzlokációját a sejtmembránon és így bejuttassa a sejtekbe és sejtorganelumokba.



4. ábra Melatonin szerkezete

Az N-acetil-5-metoxi-triptamin azaz a melatonin prekuzora a triptofán, mely egy esszenciális aminosav az emberi szervezet számára, így az élelmiszereknek eltérő triptofántartalma hatással lehet a szervezet melatonin szintjére (Dopfel és mts., 2007.). A melatonin bioszintézise az 5. ábrán látható. A szintézis triptofánból indul ki és a triptofán-hidroxiláz enzim katalízise során 5-hidroxi-triptofán jön létre. Ezután 5-hidroxitriptofán-dekarboxiláz enzim reakció során 5-hidroxi-triptamin, azaz szerotonin képződik. Majd az N-acetil transzferáz katalízise során N-acetil-szerotoninná alakul, melyet a hidroxindol-O-metil-transzferáz enzim alakít át melatoninná. Az itt ismertetett szintézis útvonal valamennyi élőlényre, az emlősökre, növényekre, gombákra és a baktériumokra is jellemző (Salisbury és Ross, 1992., Yu és Reiter, 1993., Blazer és Hardeland 1996.).



5. ábra: Melatonin bioszintézis útvonala

### 3.1.4 Melatonin szerepe a növényekben

A melatoninról sokáig úgy tartották, hogy csak a gerincesekben szintetizálódó hormon. A 90-es évek közepén a melatonint azonosították ősi prokariótákban (Manchester és mts., 1995), eukarióta egysejtűekben, rovarokban, továbbá a fotoszintézisre képes *Gonyaulax polyedra* dinoflagellateban is. Ezekben a fajokban a szabadgyökök elleni védelem szempontjából rendkívül meghatározó az N-acetil-5-metoxi-triptamin jelenléte (Poeggeler és mts., 1994). A melatonint kimutatták a növényvilágban is (Reiter és mts., 2001.), előállítása a kloroplasztiszban, mitokondriumban zajlik (Tan és mts., 2013.), felhalmozódik a levélben, termésben és a magban.

Az N-acetil-5-metoxi-triptamin kémiai szerkezetét tekintve egy indolamin, szintézise az L-triptofánból indul ki, ebből keletkezik a neurotranszmitter tulajdonságokkal rendelkező szerotonin, és az auxinok családjába tartozó indol-3-ecetsav (IAA). Mivel a melatonin és az IAA szerkezetileg hasonlóak, kutatók megvizsgálták, hogy a melatonin milyen hatással van a növekedésre. Hernandez-Ruiz és Cano, 2004-ben igazolta, hogy a melatonin hatékony növekedési faktor, mely serkenti az etiolált csillagfürt sziklevek növekedését (Hernandez-Ruiz és Arnao, 2008). Conti és munkatársai 2002-ben igazolták, hogy az intenzív UV sugárzásnak kitett alpesi és mediterrán növényeknek magasabb a melatonin koncentrációja. Reiter és mts. szerint, a növények az intenzív sugárzás hatására keletkező szabadgyökök ellen, antioxidáns hatású molekulák szintézisével védekeznek (Reiter és mts., 2007). Az N-acetil-5-metoxi-triptamin elsősorban a kloroplasztisz és a mitokondrium védelmét látja el, eliminálja a terminális oxidáció során keletkező szabadgyököket, tehát az első védelmi vonalon fejti ki antioxidáns hatását.

Figyelembe véve a mitokondrium és kloroplasztisz evolúciós eredetét. úgy tűnik, hogy ezek az intracelluláris sejtorganellumok képesek szintetizálni a melatonint (Park és mts., 2013., Wang és mts., 2012., Reiter és mts., 2002., Ozturk és mts., 2012., Acuña Castroviejo és mts., 2011., Song és mts., 2012.). A melatonin gátolja a klorofill bomlását, védi a zöld színtest integritását, továbbá elősegíti a fotoszintézis folyamatát (Tan és mts., 2012., Zhang és mts., 2013.).

## 3.2 AZ ANTOCIANINOK ÉLETTANI HATÁSA

### 3.2.1 Antioxidáns hatás

A lipidperoxidáció az a folyamat, amikor szabadgyök iniciátor kapcsolatba lép a telítetlen zsírsavak kettős kötéseivel, ezáltal peroxi-szabadgyök keletkezik. Az antocianinok hatásmechanizmusuk szerint azon antioxidánsok csoportjába tartoznak melyekre jellemző, hogy láncmegszakítók, mert képesek a szabadgyökök gyökállapotát megszüntetni azáltal, hogy hidrogént adnak át és kevésbé reaktív vegyületeket hoznak létre. Ezen vegyületekre jellemző, hogy stabilak, oxidációban nem vesznek részt, azaz megtörik a láncreakciót (Esterbauer és mts., 1992; Biró, 2003; Lugasi és Blázovics, 2004).

Az antocianinok kémiai szerkezete meghatározza farmakológiai aktivitásukat, úgy mint, antioxidáns- és gyulladásgátló hatásukat. A reaktív oxigén formák (ROS), mint a szuperoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), peroxid ( $O_2^{2\bullet-}$ ) és a peroxinitrit ( $ONOO^{\bullet}$ ) gyökök a szervezetre jellemző metabolikus folyamatok során fiziológiás körülmények között is állandóan termelődnek. Az élő szervezet folyamatosan védekezik ezen szabadgyökökkel szemben, melynek egyik formája az antioxidáns hatású enzimekkel történő védekezés, melynek része többek között a szuperoxid-dizmutáz, a glutation-reduktáz és a glutation-peroxidáz. A védekezés egy másik módja a kis molekulájú antioxidáns hatású vegyületekkel valósul meg, mint a glutation, C-vitamin, tokoferolok, valamint flavonoidok. Ha a keletkező szabadgyökök mennyisége meghaladja a szervezet antioxidáns kapacitását, akkor ezen ROS vegyületek megbontják a lipidek, DNS, fehérjék és membránstruktúrák integritását, melynek következtében működésük zavart szenved. Gyulladásos folyamatok, kardiovaszkuláris betegségek, valamint metabolikus szindróma kialakulásához vezethet, melynek részét képezi az emelkedett plazma lipid, -glükóz és -inzulin szint és a zsírmáj kialakulása, amelyek tipikusan megelőzik a Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM) kórképet (Seymour és mts., 2009).

A NIDDM 2-6-szorosára növeli a szív- és érrendszeri betegségek (Cardiovascular disease-CVD) és a halálozás kockázatát. Az atherosclerosis (érelmeszesedés) folyamata azonban megelőzheti a cukorbetegség kialakulását, ami azt sugallja, hogy mindkét rendellenességet közös genetikai és környezeti tényezők határozhatják meg. Ilyen közös pont lehet az inzulinrezisztencia, amely a II-es típusú diabetes egyik fő jellemzője, valamint növeli a szívkoronária-betegség (Coronary heart disease-CHD) kockázatát is.

Továbbá bizonyított az a tény is, hogy az inflammatorikus folyamatok fontos szerepet játszanak az atherosclerotikus CVD kialakulásában, mert a gyulladásos mediátorok kulcsfontosságú szerepet töltenek be az atherosclerotikus plakkok iniciálásában, progressziójában és leszakadásában. Ezenkívül azt is sikerült igazolni, hogy a gyulladás meghatározó szerepet játszik a NIDDM kialakulásában. Tanulmányok támasztják alá, hogy bizonyos gyulladásos markerek pl.: a C-reaktív protein (CRP) és a gyulladáscsökkentő markerek alacsony szintjei, mint például az adiponektin, növelik a NIDDM kialakulásának kockázatát. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a gyulladás és a metabolikus szindróma között az atherosclerosis jelenti a kapcsolatot (Ziegler, 2005). Ebből az következik, hogy az életmódváltással és a magas antioxidáns kapacitású bioaktív vegyületeket tartalmazó zöldségek és gyümölcsök fogyasztásával csökkenthető mindkét betegség kialakulásának kockázata. Egy 2018-ban megjelent irodalom részletesen beszámol a meggy gyümölcs bioaktív komponenseinek, cardiovascularis betegségekben és a II-típusú DM-ban előforduló közös kulcsenzimeinek (angiotenzin I-konvertáló enzim ACE, lipoxigenáz, xanthine-oxidáz, cyclooxygenáz COX-1, COX-2,  $\alpha$ -glukozidáz,  $\alpha$ -amiláz) működésére gyakorolt inhibíciós hatásáról (Kirakosyan és mts., 2018).

Mulabagal és munkatársai 2007-ben *in vitro* kísérletekkel igazolták a cianidin-3-glükózid > cianidin-3-rutinozid > cianidin-3-glükózilrutinozid lipid peroxidációt gátló hatását 0,25  $\mu$ M koncentrációban. A 2012-ben készült tanulmányban foto-oxidatív stresszt indukáltak humán bőr fibroblaszton, és vizsgálták a CAT és a SOD enzimek aktivitását. Azt tapasztalták, hogy a sugárzás jelentősen csökkenti a CAT és a SOD aktivitást, míg az antocianinnal kezelt sejtekben fokozott enzim aktivitást figyeltek meg (Lyu és mts., 2012). Hím Wistar patkányokon *ex vivo* és *in vivo* vizsgálatokkal igazolták, hogy az antocianinok növelhetik a glutation-peroxidáz (GPx) és a glutation reduktáz (GR) aktivitását, ezáltal növelve a redukált glutation (GSH) tartalmat, miokardiális infarktuszban (Toufektsian és mts., 2008). Egy másik tanulmány arról számolt be, hogy a 2,5  $\mu$ g/mL malvidin, és peonidin aglikon növeli az antioxidáns hatású enzimek aktivitását HT-29 human adenocarcinoma sejteken, míg a korábban említett antocianin aglikonok 2,5  $\mu$ g/mL keveréke szinergista módon, szignifikánsan emeli a GR, GPx és a GST aktivitását 55%, 21%, és 42%-ban (Turner, 2009). Több irodalom beszámol arról, hogy a flavonoidok fokozzák a glutation szintézis sebességét meghatározó  $\gamma$ -glutamil-cisztein szintetáz kódoló gén expresszióját (Myhrstad és mts., 2002; Moskaug és mts., 2005). Az

antocianinok hatásosan eliminálják a peroxinitritet. Muselík és munkatársai *in vitro* körülmények között, megvizsgálták a főbb polifenolos vegyületek, köztük az antocianinok antioxidáns hatását. A cianidin-3-rutinozid jobban eliminálja a peroxinitritet, mint a malvidin-3-glükózid, majd ezt követi a delfinidin-3-glükózid és végül a petunidin-3-glükózid (Muselík és mts., 2007).

Nizamutdinova és mts egy 2009-ben megjelent tanulmányban fekete szójababból készített extraktum (mely 72%-ban tartalmazott cianidin-3-glükózidot) hatását tanulmányozták Streptozocinnal (STZ) indukált diabeteszes patkányokon. Azt tapasztalták, hogy a diabeteszes patkányoknál jelentősen csökkent a SOD és CAT aktivitás. Amikor a STZ-nal kezelt állatok kiegészítésként 50 mg/kg/nap antocianint kaptak azt tapasztalták, hogy a SOD és CAT aktivitás jelentősen növekedett (Nizamutdinova és mts., 2009).

### **3.2.2 Gyulladáscsökkentő hatás**

A gyulladásos folyamatokat külső és belső ingerek indíthatják el. Ezen ingerek hatására hisztamin, a foszfolipáz A<sub>2</sub> enzim hatására pedig arachidonsav szabadul fel a sejtmembránból. A felszabaduló arachidonsav szubsztrátja a ciklooxygenáz enzimnek (COX) melyből először egy endoperoxid (PGG<sub>2</sub>) nevű intermediér keletkezik, melyre jellemző, hogy fájdalomkeltő, szövetkárosító hatása van, valamint vazokonstriktációt okoz. Ezen PGG<sub>2</sub>-ből alakulnak ki a prosztaglandinok, melyek jelentős feladatot látnak el a fájdalom, láz és a gyulladás mediálásában. Bár a gyulladás menete alapvetően egy jótékony célú folyamat, de abban az esetben, ha a gyulladás sokáig és tartósan fennáll, önmaga válhat betegségek okozójává.

Mulabagal és munkatársai 2007-ben *in vitro* kísérletekkel igazolták a cianidin-3-glükózid > cianidin-3-rutinozid > cianidin-3-glükózilrutinozid a COX I enzimre gyakorolt inhibíciós aktivitását 5 µM koncentrációban. Továbbá vizsgálták a COX II enzimre gyakorolt inhibíciós aktivitást is és azt tapasztalták, hogy a cianidin-3-glükózid > cianidin-3-rutinozid > cianidin-3-glükózilrutinozid 5 µM koncentrációban gátolja az enzimet. Ezen vizsgálatokhoz pozitív kontrollként az aszpirint vették alapul és a méréseik során igazolták, hogy a cianidin-3-glükózid alacsonyabb COX I inhibíciós aktivitással jellemezhető, mint az aszpirin. Viszont ugyanezen molekula COX II inhibíciós aktivitása magasabb volt. Egy korábbi *in vitro* ciklooxygenáz inhibíciós vizsgálat azt is igazolta, hogy a cianidin aglikon hatásosabb gyulladáscsökkentő mint az aszpirin (Wang és mts.,

1999). A meggyfajták a magas antocianin tartalmuknál fogva képesek fokozni a szervezet ellenállóképességét a gyulladásos folyamatokkal szemben, valamint csökkentik a kockázatát a gyulladásos folyamatok által indukált egyéb betegségeknek is (Mulabagal és mts., 2009).

A foszfolipáz A<sub>2</sub> által katalizált folyamatok során felszabaduló arachidonsavból számos gyulladásos mediátor szintetizálódik. A humán lipoxigenázok közül az 5-lipoxigenáz kulcsfontosságú enzim, felelős a biológiailag aktív leukotriének bioszintéziséért, amelyek hatásos mediátorok a gyulladásos és allergiás reakciókban. Az így létrejövő betegségek megelőzése érdekében az 5-lipoxigenáz-gátlás terápiás célpont lehet. Az egyes antocianin komponensek, humán neutrofil granulocitákból izolált, lipoxigenáz enzimre gyakorolt inhibíciós aktivitásvizsgálatánál megállapították *in vitro* módon, hogy a delfinidin-glükozidoknak, majd a cianidin-glükozidoknak volt nagyobb az inhibíciója, míg a malvidin-glükozidok inhibíciós aktivitása kisebb (Knaup és mts., 2009). A makrofágokból felszabaduló citokinek közül a komplex hatása miatt az egyik legjelentősebb a TNF- $\alpha$ , mert jelentős szerepe van a gyulladás valamennyi komponensének megjelenésében. A kemokinek szabályozzák a leukocita migrációt. Az egyik legjelentősebb kemokint a monocita kemotaktikus protein-1-t (MCP-1) az endothél sejtek szekretálják akut és krónikus gyulladásos betegségek esetén. Az antocianinok védelmet nyújtanak a TNF- $\alpha$  által indukált MCP-1 szekréció ellen a humán endothél sejtekben (Suganami és mts., 2005).

A közelmúltban az amerikai felnőtt populációban végzett vizsgálat során kimutatták, hogy a magas antocianin tartalmú étrend fogyasztása gyulladásgátló hatású. Ezek az eredmények bizonyítékot szolgáltatnak arra vonatkozóan, hogy a rendszeres antocianinokban dús táplálkozás, kulcsfontosságú tényező lehet krónikus betegségek kockázatának csökkentésében (Cassidy és mts., 2015).

### **3.2.3 Kardiovaszkuláris hatás**

A szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának okai között elsősorban a magas vérnyomás, a fokozott trombocita aggregáció, a vaszkuláris endothelium megváltozott működése és a magas plazma LDL koleszterinszint szerepel. Számos tanulmány vizsgálta az antocianinok vérnyomás szabályozó hatását. *In vitro* módon igazolták, hogy a cianidin- és delfinidin-glükozidok  $\mu$ M-os koncentrációban, kompetitív módon képesek gátolni az angiotenzin I konvertáló enzimaktivitását (Ojeda és mts., 2010).

Egy 2004-ben bemutatott tanulmány arról számol be, hogy a cianidin-3-glükozid természetes aktivátora lehet a nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) enzimnek. Ez a folyamat két úton valósulhat meg. A rövidtávú hatás, amely az eNOS enzim, Ser1179 foszforilációja és a Ser 116 defoszforilációja során valósulhat meg (Xu és mts., 2004). A hosszútávú hatása a cianidin-3-glükozidnak, hogy indukálja a eNOS expresszióját és növeli a NO-felszabadulását idő és dóziszfüggő módon. A cianidin-3-glükozidok megőrzik az endothél egészséges működését, szabályozzák a vérnyomást, így védelmet nyújt az atherosclerosis ellen, azaz vazoprotektív hatásúak. Az antocianinok védelmet nyújtanak az aktivált vérlemezkék által kiváltott adhézios molekulákkal szemben, ezáltal gátolják a trombocita aggregációt (Liang és mts., 2006).

Youdim és mts., 2000-ben megjelent tanulmánya arról számolt be, hogy humán aorta endothél sejtkultúrát oxidatív stressznek kitéve, az egyes antocianin-glikozidok (cianidin-3-glükozid, cianidin-3,5-diglükozid, cianidin-3-sambubiozid és a cianidin-3-sambubiozid-5-glükózid) védelmet nyújtanak az endothél sejteknek. Eredményeik alapján azt is igazolták, hogy az antocianinok beépítése a citoszolba és a sejtmembránba, jelentősen növelte az endothél sejtek ellenállóképességét a reaktív oxigén formák (ROS) káros hatásaival szemben. Az antocianinok legszembetűnőbb hatása az volt, hogy védelmet nyújtottak a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel indukált sejteknek, azaz a sejtek életképesek maradtak. Humán köldökvéna endothél sejt (HUVECs) modellen igazolták, hogy az antocianinok (cianidin-3-glükozid, delphinidin-3-glükozid, petunidin-3-glükozid) gátolják a TNF- $\alpha$  indukálta VCAM-1 expresszióját koncentrációtól függően, de nem gátolják az intracelluláris adhézios molekula-1-t (ICAM-1) (Nizamutdinova és mts., 2009).

Steffen és mts (2008) HUVEC modellen igazolták a flavonoidok inhibíciós hatását a NADPH-oxidáz enzimén. Az antocianinok szerkezetéből adódik értágító hatásuk, mely csökkenti a magas vérnyomás kialakulásának kockázatát. (Cassidy és mts., 2011).

A 2008-ban megjelent tanulmány részletesen beszámol az antocianinok kardioprotektív hatásáról, melyet patkány szív ischemia/reperfúziós *ex vivo* és *in vitro* vizsgálata során tapasztaltak. Szignifikáns különbség volt az infarktus nagyságában. Az antocianinok kardiális redox homeosztázisra gyakorolt hatását a glutation-tartalom mérésével igazolták. Azt tapasztalták, hogy a preischemiás szív teljes glutation szinje nagyobb volt az antocianinban gazdag táplálékot fogyasztó patkányok között, mint a másik csoportban. Ugyanezen vizsgálatot megismételték *in vivo* modellen és hasonló eredményre jutottak. Ezen eredmények szerint a glutation intracelluláris szintjének szabályozása lehet az egyik olyan mechanizmus, amivel az antocianinok képesek befolyásolni a betegség

kialakulását, tehát az ischaemia-reperfúziós károsodás során, az antocianinok részben hozzájárulnak a szív antioxidáns védekezésének javulásához.

Ezen eredmények szerint, az antocianinok folyamatosan ellátják a szív antioxidáns védelmét és képesek csökkenteni az ischaemia-reperfúzió okozta károsodást *ex vivo*, valamint *in vivo* modellben (Toufektsian, és mts., 2008).

Egy 2013-ban megjelent tanulmány 18 éven át tartó kutatási eredményt mutat be. 93 600, 25-42 év közötti nőt vizsgáltak. Azt tapasztalták, hogy a magas antocianintartalmú étel fogyasztása (akik hetente 3x fogyasztottak fekete áfonyát és epret) a fiatal és a középkorú nők körében csökkentette a miokardiális infarktus kockázatát, melyet rendszeres orvosi és elektrogardiográfiai (EKG) vizsgálattal, valamint az akut miokardiális infarktus esetén felszabaduló enzimek rendszeres mérésével igazoltak. Ha haláleset történt akkor patológiai vizsgálattal igazolták a halál okát (Cassidy és mts., 2013).

### **3.2.4 Zsír- és szénhidrát anyagcserére gyakorolt hatás**

Az emelkedett plazma lipidek, a glükóz, az inzulin és a zsírmáj a metabolikus szindróma (metabolikus kockázati tényezők) összetevői közé tartoznak, ezek jellemzően megelőzik a II. típusú diabétesz kialakulását. Állatkísérletek azt mutatják, hogy az antocianinok bevétele csökkenti a hiperlipidémiát, az obezitást és az ateroszklerózist. Az antocianinok ezen hatásokat a szövet peroxiszóma proliferátor-aktivált receptorok (PPARs-k) módosított aktivitásával együttesen gyakorolhatják. Seymour és munkatársai, 2008-ban megjelent tanulmányában arról számol be, hogy porított meggyet etettek hiperlipidémiában és hiperinzulinémiában szenvedő patkányokkal 6 héten át. Mérések során azt tapasztalták, hogy a meggyel kiegészített étrendet fogyasztó patkányok teljes koleszterin-, összes triglicerid-, glükóz-, inzulinszintje szignifikánsan csökkent, a plazma teljes antioxidáns kapacitása szignifikánsan növekedett, szemben a kontroll csoporttal. A kezelt csoportnál szignifikánsan növekedett a májsejtekben a PPAR- $\alpha$  expressziója, szemben a kontroll csoporttal. Ezenkívül az Acyl-coenzim A oxidáz (ACO) fokozott expresszióját és aktivitását is tapasztalták a kezelt csoportoknál. Mérések alapján arról is beszámoltak, hogy a meggyel dúsított étrendet fogyasztott patkányoknak csökkent az éhgyomri vércukor és -inzulin szintje, és ezek a hatások a meggyben előforduló antocianinok által közvetített PPAR- $\gamma$  agonizmusnak tulajdoníthatók. Ebből következik, hogy hatással vannak az inzulinrezisztencia patogenezisére és az NIDDM-ra is (Seymour és mts., 2008). Egy 2008-ban megjelent tanulmánya arról számolt be, hogy az antocianin

indukálja az adiponektin génexpresszióját, javítja az adipocita funkciót *in vitro* és *in vivo* modellen, ezáltal fontos szerepe lehet a metabolikus szindróma megelőzésében (Tsuda., 2008).

A NIDDM-ben szenvedők száma világszerte növekszik. Ezt a betegséget az inzulinrezisztencia és a hasnyálmirigy Langerhans szigeteiben elhelyezkedő  $\beta$ -sejtek diszfunkciója jellemzi, amely mikro- és makrovaszkuláris szövődményekhez vezet. Több tanulmány arról számol be, hogy a delfinidin-3-glükozid, cianidin-3-glükozid, pelargonidin-3-galaktozid fokozzák az inzulin szekréciót (Jayaprakasam és mts., 2005; Roy és mts., 2008; Nizamutdinova és mts., 2009). Vizsgálták a cianidin-3-glükozid hatását a 3T3-L1 adipocita sejt kultúrán a  $H_2O_2$ - és TNF- $\alpha$ -indukálta inzulinrezisztenciát. Azt tapasztalták, hogy a cianidin-3-glükozid védi a 3T3-L1 adipocitákat a JNK-IRS1 jelátviteli útvonal gátlásával, azaz a c-Jun NH<sub>2</sub>-terminál kinázaktivitását gátolja (Guo és mts., 2008). Vizsgálták, az antocianin hipoglikémiás hatását, a STZ által indukált cukorbeteg patkányoknál, szív- és vázizom szöveteiben zajló GLUT-4 transzlokációját. Azt tapasztalták, hogy az antocianinok szignifikánsan befolyásolták ezen patkányoknál a szív- és vázizomban történő GLUT-4 expresszióját, valamint növelték a GLUT-4 transzlokációját, ezáltal fokozták glükóz felvételt a sejtekben (Nizamutdinova és mts., 2009). A vércukorszint csökkentésének másik lehetősége, ha a keményítő lebomlását még a gastrointestinalis tractuson (GIT) belül gátolják. Az  $\alpha$ -glükozidáz enzim a vékonybél epitéliumában található, amely felelős a szénhidrátok hidrolíziséért (Gray, és mts., 1979). Számos polifenolt tartalmazó extraktumokról igazolt, hogy hatékony  $\alpha$ -glükozidáz inhibitor, csak úgy, mint a szintetikus inhibitorok pl.: az akarbóz, amelyet jelenleg terápiásan alkalmaznak a NIDDM-ban szenvedőknél (Toeller, 1994). Adisakwattana és mts., (2011) *in vitro* vizsgálatokkal igazolták, hogy a cianidin-3-rutinozid hatásos az úgynevezett étkezés utáni hiperglikémia csökkentésére az intesztinális  $\alpha$ -glükozidáz gátlásával. Ezenkívül az akarbózzal kombinálva szinergikus gátlást is igazoltak. Továbbá, a cianidin-3-rutinozid késlelteti az étkezési szénhidrátok emésztését és felszívódását a vékonybélben. Így az étkezés utáni hirtelen kialakuló vércukorszint emelkedést gátolja. A cianidin-3-rutinozidban dús gyümölcsök fogyasztása csökkentheti a posztprandiális hiperglikémia kockázatát, eredményes lehet a diabetes és szövődményeinek prevenciójában. Amerikai populáción végzett tanulmány szerint a magas antocianin bevitel csökkenti a NIDDM kockázatát (Wedick és mts., 2012). Tehát az antocianinok azáltal csökkentik a vércukorszintet, hogy javítják az

inzulinrezisztenciát, védik a  $\beta$ -sejteket, megnövelik az inzulin szekrécióját és csökkentik a cukrok emésztését a vékonybélben.

### **3.2.5 Daganatos megbetegedésekre gyakorolt hatás**

A világ népességének több mint 1/3-át érintik a daganatos megbetegedések melyek 20%-a halállal végződik. A jó- és a rosszindulatú daganatokra egyaránt jellemző, hogy a sejtek kikerülnek az osztódást szabályozó ciklus alól és így abnormális, szabályozatlan osztódás jön létre, mely a testszövetek invázióját eredményezi. A gyümölcsökben, zöldségekben és a magvakban jelen lévő bioaktív komponensek hatékony védelmet nyújtanak különböző típusú daganatos megbetegedések ellen. Mivel az antocianinok sokféle biológiai funkciót képesek modulálni, ezen mechanizmus révén képesek lehetnek a karcinogenezist is szabályozni. Kutatók tanulmányaikban arról számolnak be, hogy az antocianinok képesek a sejtciklus megállítására G1 és G0, valamint a G2 és M fázis között. A peonidin-3-glükózid kezelés a ciklin-dependens kináz CDK-1, CDK-2 kapcsolódó ciklin B1 és ciklin E expresszióját csökkenti, míg a cianidin-3-glükózid kezelés a CDK-1, CDK-2 kötődő ciklin B1 és ciklin D1 expresszióját csökkenti (Chen és mts., 2005). Az antocianinok képesek a daganatos sejtek apoptózist a belső mitokondriális útvonalon és a külső halál receptor útvonalon keresztül indukálni. A mitokondrium által közvetített apoptózis a kaspázfüggő és kaspáz-független útvonalakat foglalja magában. Az antocianinok képesek a kaspázfüggő kaskádon keresztül aktiválni az apoptózist (Shih és mts., 2007; Lee és mts., 2009; Charepalli és mts., 2016). Kamei és mts., 1995-ben megjelent tanulmányában arról számolt be, hogy az antocianinok sokkal hatékonyabb daganat ellenes szerek, mint az egyéb flavonoidok. Az antocianinoknak a vastagbélrákos sejtekre gyakorolt antiproliferatív hatása szerkezetfüggő. A nem-acetilezett monoglükózid antocianinok, mint a cianidin-3-glükózid hatékonyabban képes a vastagbélráksejt-növekedés gátolni, mint a pelargonidin aglikon, mely kevésbé volt antiproliferatív hatású. (Jing és mts., 2008).

### 3.3 AZ ANTOCIANINOK SZEREPE A SZÁJÜREGI EGÉSZSÉG MEGŐRZÉSÉBEN

Számos tanulmány foglalkozik a különböző növényekből származó fitokémiai anyagok antibakteriális hatásaival, melyet a patogén és cariogén hatású *Streptococcus* fajokon teszteltek. Az eredmények arról számolnak be, hogy ezek a fitokémiai anyagok a *Streptococcus* fertőzések kezelésére jelenleg használt klasszikus antibiotikumok alternatívái lehetnek.

Ezen polifenolokról a közvetkező hatásokat igazolták:

- gátolják a bakteriális adhéziót a garat, a bőr és a fogak felületéhez ill. a nyálkahártya felszínéhez
- glikolitikus enzimek gátlása
- biofilm és a plakk-képződés csökkentése; és sejtfelszíni hidrofóbitás megváltoztatása.

Különösen nagy figyelmet szenteltek a polifenolok antibakteriális hatásának igazolására melyet a cariogén tulajdonságokkal rendelkező *S. mutans*-on vizsgáltak. A kereskedelembe előforduló és frissen készített, polifenolban gazdag kivonatok (a zöld és fekete teák, a citrom, a fahéj, a hibiszkusz, a borsmenta, a szőlőmag, a kakaó, a szeder és a bogyósok-, a gránátalma-, a fekete ribizli-, és a galagonya héját, valamint a vörös és fehér bor) hatását vizsgálták a szájüregben előforduló *Streptococcus* törzseken (*S. mutans*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. salivarius*, *S. sanguis*). Az összes vizsgált termék 0,25–32 mg/ml koncentrációban minimális gátló hatást mutatott (Smullen és mts., 2007).

A 25%-os áfonya kivonat és azok tiszta komponenseiről kimutatták, hogy gátolják a *Streptococcus* fajok adhézióját, valamint a plakk- és biofilmképződést is. A 25%-os áfonya kivonat 500 µg / ml koncentrációban jelentősen gátolta a *S. sobrinus* és *S. sanguinis* biofilm képződését, továbbá több mint 40% -kal csökkentette a *S. mutans* és a *S. sobrinus* 6715 sejtfelszíni hidrofób tulajdonságát (Yamanaka és mts., 2004).

Feng és mts., 2013-ban megjelent tanulmányában, lokális expozíciót modelleztek, nyálbevonattal ellátott hidroxipatit biofilm modellen. A kezelést 100 µM koncentrációjú tisztított proantocianidin tartalmú áfonya-frakcióval végezték, naponta kétszer 60 másodpercig. Csökkent biofilm felhalmozódást tapasztaltak, valamint csökkent a tapadásra képes baktériumok biomasszája és az EPS vastagsága is. Ennek magyarázata lehet, hogy a szacharózfüggő bakteriális kötődéshez kapcsolódó gének (*rmpC*, *mepA*, *sdCB* és *gbpC*) expresszióját a proantocianidinek visszaszorították. Ebben a

tanulmányban igazolták azt is, hogy az áfonya proantocianidinben dús kivonata hatékonyan képes gátolni a cariogén biofilmek felhalmozódását. Wang pedig a tea polifenoljainak gátló hatását igazolta a *Streptococcus* sp. adhézíójára vonatkozóan (Wang és mts., 2013). In vitro kísérletben sikerült igazolni, hogy a kávéból izolált polifenolok 91%-ban gátolják a *S. mutans* szacharóz függő tapadását, növekedését, valamint biofilm képződését. Ezen komponensekben dús kávé-italok fogyasztása képes gátolni a *S. mutans* virulenciáját meghatározó tényezőket, ezáltal megakadályozza a fogszuvasodás kialakulását és antioxidáns hatást fejt ki a cariogén gyulladásos folyamatban részt vevő szabadgyökök ellen (Stauder és mts., 2010).

Ezen túlmenően tanulmányok arról számoltak be, hogy a polifenolokban gazdag kivonatok gátolják a *Streptococcus* fajok glükozil-transzferáz aktivitását, valamint az aggregációt és kvórum érzékelést is. Az áfonya kis molekulatömegű polifenoljai 500 µM-os koncentrációban csökkentették a *S. mutans* sejtek glükán szintézisét. A glükozil-transzferázokra gyakorolt inhibíció 15-45% között váltakozott (Gregoire és mts., 2007).

Vizsgálták az áfonyában lévő flavonolok, antocianinok és a proantocianidinek gátló hatását a *Streptococcus mutans* által termelt biofilm képződésre. Tanulmányozták a glükozil-transzferáz B és a F-ATPáz aktivitást, és azt tapasztalták, hogy a gyümölcs nyers kivonatának enzim aktivitása a kontrollhoz képest jelentősen csökkent. A glükozil-transzferáz aktivitás 35% az inhibíció 65%-os volt, míg a F-ATPáz aktivitás 18% az inhibíció 82%-os volt (Duarte és mts., 2006).

Az antocianinokról a közvetkező hatásokat igazolták:

- baktericid hatás, *in vitro* modellen
- glükozil-transzferáz B és C gátlás
- F-ATPáz gátlás

Hevesi és mts., 2012-ben megjelent *in vitro* tanulmányában arról számol be, hogy a meggy gyümölcs az orális egészséget befolyásoló baktericid hatással rendelkezik. Eredményeik alapján a magyar meggyfajtákban az érés során fokozódó antocianin koncentráció korrelált a vizsgált fajták baktericid hatásával.

Egy másik tanulmány, mely 2007-ben jelent meg hasonló hatásról számolt be. Kutatásukba a *Vitis vinifera*-át és a borászatból ismert különböző fajtahibrideket (irodalomból ismert, hogy magas polifenol tartalommal és változatos antocianin tartalommal jellemezhető köztük delphinidin, petunidin, malvidin, cianidin, peonidin)

vizsgálták. A glükózil-transzferáz B és C gátlás 62,5 µg/ml koncentrációnál 70-85%-os volt, a F-ATPáz gátlás 125 µg/ml koncentrációnál 30-65%-os volt (Thimothe és mts., 2007).

Ezen eredmények azt bizonyítják, hogy az áfonyában és a szőlőben előforduló biológiailag aktív komponensek együtt és a saját biológiai mátrixukban kémiai struktúrájukat megőrizve és egymás hatását erősítve hatásos módon képesek csökkenteni a *S. mutans* virulenciáját, továbbá ezen komponensek megakadályozhatják a fogszuvasodás kialakulását és kifejthetik antioxidáns hatásukat a cariogén gyulladásos folyamatban részt vevő szabadgyökök ellen.

Érdemes megjegyezni, hogy a természetes antimikrobiális készítményeknek nem feltétlenül kell baktericidnek lenniük. Valószínű, hogy egy vegyület hatékony bakteriális növekedésgátló, ha ronthatja a citoplazmatikus pH-értéket, növeli a plazmamembrán permeabilitását, megakadályozza az extracelluláris és intracelluláris mikrobiális enzimek termelését, megszakítja a bakteriális metabolikus útvonalakat, vagy megzavarja a plakkot és a biofilm képződését.

### 3.4 A MELATONIN ÉLETTANI HATÁSA

A tobozmirigy által termelt melatonin az emberi test cirkadián ritmusának szabályozásában szerepet játszó hormon. Csúcs koncentrációját a plazmában 3:00 és 4:00 óra között éri el (Claustrat és mts., 2015). A gasztrointesztinális traktusban előforduló entero-endokrin (EE) sejtekben mintegy 100-400x nagyobb mennyiségben keletkezik a melatonin, mint a tobozmirigyben (Konturek és mts., 2007). A 90-es évektől az irodalom a melatonint, mint antioxidánst és immunmodulátort tartja számon. A melatonin képes eliminálni mind a nitrogén, mind az oxigén tartalmú szabadgyököket például a nitrogén-monoxidot, biztosítva ezáltal a NO egyensúlyt (Noda és mts., 1999), valamint a peroxinitrit okozta oxidatív károsodások ellen is védelmet nyújt (Gilad és mts., 1997), továbbá eliminálja a  $\bullet\text{OH}$ , a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a singlet oxigént ( $\text{O}_2 \bullet^-$ ), és gátolja a lipidperoxidációt. A melatonin első (ciklin-3-hidroximelatonin), második  $\text{N}^1$ -acetyl- $\text{N}^2$ -formyl-5-methoxy-kinuramin (AFMK) és harmadik  $\text{N}^1$ -acetyl-5-methoxy-kinuramin (AMK) generációs metabolitjaira egyaránt jellemző, hogy bár eltérő mértékben, de képesek a reaktív oxigénformák (ROS) és a reaktív nitrogénformák (RNS) eliminálására (Hardeland és mts., 2005; Galano és mts., 2013; Reiter és mts., 2014). A legfontosabb kismolekulájú antioxidánsok a C-vitamin, az E-vitamin, valamint a glutation. Az irodalom ezen molekulákat, mint klasszikus antioxidánsokat tartja számon, jellemző rájuk, hogy potenciális elektron donorok. Ezen molekulák elektron donációban vesznek részt, melynek célja a szabadgyök semlegesítése. Ha a C- és az E-vitamin részt vesz a szabadgyök megkötésében akkor a szervezetnek biztosítania kell a sejten belüli redukáló erőt, mely mindig a GSH és a NADPH rovására zajlik, pedig a GSH sok esetben jobb antioxidáns, mint a korábban említett vitaminok (Winkler és mts., 1994). Meg kell jegyezni, hogy ez a fajta újrahasznosítás előnyös a biológiai membránok számára, ahol az E-vitamin a legjobb lánctörő antioxidáns és jelentős szerepe van a membránok oxidatív károsodás elleni védelemében. Ezzel szemben a melatonin a megszokottól eltérő kémiai tulajdonságot mutat, ezáltal az antioxidánsok fontos új csoportját képezheti a klasszikus antioxidánsoktól eltérő hatásmechanizmusa miatt. Az elektronban gazdag indol-gyűrű az 5-ös pozícióban rendelkezik egy metoxi-csoporttal, mely növeli a melatonin molekula kapacitását a párosítatlan elektron megkötéséhez (Poeggeler és mts., 1993), valamint gátolja a prooxidációt is (Tan és mts., 1999; Reiter és mts., 2014). Ha egy melatonin molekula kettő  $\text{OH}\bullet$ -t megköt akkor kialakul a ciklikus-3-hidroximelatonin mely a

vizelettel kiürül (Tan és mts., 1999). Ha egy melatonin molekula eliminálja a  $\text{H}_2\text{O}_2$  akkor AFMK-vá alakul és nem vesz részt redox ciklusban a szabadgyök megkötése után. Ebből következik, hogy a melatonin a sejt homeosztázisát megőrzi, a GSH-GSSG egyensúly fenntartása révén, sőt a GSH arányát növeli a szövetekben (Hara és mts., 1997; Montilla és mts., 1998). Így a melatonin egy végső antioxidáns. További előnye a melatoninnak, hogy származása lehet exogén eredetű, amikor táplálkozással kerül a szervezetbe és lehet endogén eredetű, amikor a szervezet elő állítja, szemben a C- és az E-vitaminnal, amit az emberek csak a táplálékkal tudnak bevenni. Ha ezen vitaminok az étrendből hiányoznak, akkor a fent említett szabadgyök megkötés klasszikus antioxidánsokkal zavart szenvedhet. A korábban felsoroltak a melatonin direkt hatásának köszönhető, de ismert a melatonin indirekt hatása is. A melatonin stabilizálja a mitokondrium belső membránját és modulálja az  $\text{O}_2$  redukciója során kialakuló elektron szivárgást, ezáltal képes az oxidatív stresszt szabályozni. 1997-ben megjelent *in vitro* tanulmány szerint a tenyésztett J774 makrofágokhoz hozzáadott melatonin csökkentette a peroxinitrit által okozott mitokondriális légzési lánc gátlását (Gilad és mts., 1997). Ezen kívül több tanulmány is arról számol be, hogy a melatonin modulálja a mitokondriális légzési lánc elemei közöttük a komplex I és komplex IV működését, gátolja a mitokondriális toxicitás kialakulását (Absi és mts., 2000; Martín és mts., 2000). Az aerob sejtekben az oxidatív foszforiláció folyamata során a teljes ATP termelés 95%-a a mitokondriumban zajlik. Az elektronok átadását az ubiquinon (UQ) és a citokróm c végzi. A folyamat során az  $\text{O}_2$  vízre redukálódik, amelyhez négy elektron szükséges, amely a  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  és  $\bullet\text{OH}$  kialakulását eredményezheti. Ezeknek a szabadgyököknek a termelése a mitokondriumok membrán struktúrájának integritását megbontják melynek következtében működésük zavart szenved. A mitokondriális szinten bekövetkező károsodás súlyosan veszélyeztetheti az ATP termelést, és a sejtek apoptózis vagy nekrozis útján történő halálához vezethet. Érthető módon az öregedés folyamatát gyakran magyarázzák a mitokondrium elmélettel, melynek lényege, hogy ezen sejtsejtszervekben keletkező nagymennyiségű szabadgyök a felelős a sejt, a szerv és a szervezet öregedéséért. Ezen gondolatmenet jogosan feltételezi, hogy az antioxidánsok megoldást jelenthetnek a szervezet öregedésének késleltetésében. Ehhez viszont az antioxidánsok koncentrációjának növelése szükséges a mitokondrium belsejében. Ennek érdekében mitokondriumot célzó antioxidánsokat hoztak létre Q10 és E-vitaminból (Galley, 2010). A cél az volt, hogy koncentrálják a mitokondrium mátrixba bejutó Q10 és E-vitamin arányát (100-500x). Ezen targeteket és a melatonin hatását vizsgálták LPS-sel kezelt patkányokon. 5 órával a kezelés után szövet és vérmintákat

vettek. Azt tapasztalták, hogy a három antioxidáns nagyjából azonos mértékben nyújt védelmet a mitokondriális légzési lánc számára, valamint csökkentik az oxidatív károsodást és a pro-inflammatorikus citokinek arányát (Lowes és mts., 2013). Ezen tanulmány a melatonint jobb, de legalább olyan hatásosnak ítéli meg, mint a szintetikus úton létrehozott mitokondrium-targeteket. Ebből az következik, hogy a melatonint úgy kell tekinteni, mint egy a mitokondriumot célzó antioxidánst. Martín és munkatársai arról számoltak be, hogy míg a melatonin 100 nM koncentrációban képes volt növelni a mitokondriumban a GSH szintet és csökkenteni a GSSG koncentrációt, addig a C-vitamin erre nem volt képes, az E-vitaminnak pedig csak 1000 µM koncentrációban volt ilyen hatása. Továbbá azt is megállapították, hogy a melatonin a GPx és GR aktivitását 4-8 szorosára növelte a mitokondriumban, míg a C- és E-vitamin nem tudott hasonló hatást elérni. Valamint bizonyították, hogy a melatonin 100 nM-os koncentrációban jelentősen növeli a mitokondriumra jellemző komplex I és komplex IV aktivitását, míg a C- és E-vitamin ezt a hatást nem váltotta ki (Martín és mts., 2000). A melatonin dózistól függően számos módon fejti ki antioxidáns hatását, az egyik lehetőség, hogy közvetlenül képes a szabadgyökök eliminálására. A másik lehetőség, hogy képes az antioxidáns enzimek aktivitását vagy génexpresszióját fokozni pl: SOD, GPx, GR és CAT (Pablos és mts., 1998; Mayo és mts., 2002; Tomás-Zapico és mts., 2005). Továbbá bizonyították, hogy a melatonin fokozza az intracelluláris glutation szint koncentrációját azáltal, hogy stimulálja egy a sebességet meghatározó enzim, a  $\gamma$ -glutamil-cisztein szintáz expresszióját, továbbá a megnövekedett glutation szint védi a sejteket az oxidatív stressz ellen és szabályozza a sejtproliferációt (Urata és mts., 1999). de la Rocha és mts., 2007-ben megjelent tanulmánya arról számol be, hogy a melatonin kötődik a COX-1 és COX-2 aktív helyéhez és ezáltal természetes módon képes modulálni ezen enzimek aktivitását.

### 3.5 A MELATONIN SZEREPE A SZÁJÜREGI EGÉSZSÉG MEGŐRZÉSÉBEN

A szájüreg egészségét nagyban befolyásolják a gyulladásos folyamatok így a tobozmirigyen kívül szintetizálódó és diffúzóval a nyálba kerülő melatoninnak jelentős szerepe lehet a szabadgyökök eliminálásában, valamint a gyulladásos folyamatok csökkentésében. A periodontitis a fogakat körülvevő, tartó szövetek és csontok, azaz a periodontium bakteriális fertőzése mely kezelés nélkül ezen szövetek fokozott pusztulását, valamint a fogak elvesztését eredményezi. A melatonin csökkentette az oszteoklaszt aktivitást, az alveoláris csontvesztést a diabéteszes patkányokban (Balci Yuce és mts., 2016). Egy 2016-ban megjelent tanulmány részletesen foglalkozik a melatonin *Porphyromonas gingivalis* gyakorolt hatásával, amely egy a periodontális betegséget okozó baktérium. Kísérleteik során megállapították, hogy a melatonin dóziszfüggő módon csökkenti a már kialakult biofilm életképességét, továbbá gátolja a biofilm képződését. A biofilm képződésének gátlása nagymértékben hozzájárulhat a bakteriális növekedés csökkenéséhez. Azáltal, hogy a melatonin lipofil tulajdonságú képes átjutni a sejtmembránon. Továbbá arról is beszámolnak, hogy a melatonin gátolja az IL-6 (mikrobiológiai felismerés után termelődő kemoatrktáns mely részt vesz a periodontális betegség kialakulásában) és az IL-8 (periodontális betegség fő kemoatraktánsa) termelődését. Megállapították, hogy a melatonin gátolta a virulencia faktorok kifejeződését, stimulálhatják gyulladásos faktorok termelését, például az interleukinokat (IL), amelyek részt vesznek a fogínygyulladásának aktiválásában és periodontális betegség kifejlődésében (Zhou és mts., 2016).

A melatoninról összefoglalva elmondható, hogy szerepet játszik a szabadgyökök (ROS és NOS) eliminálásában, képes inhibálni a ciklooxygenáz 2 enzim aktivitását és feltételezhetően valamennyi metabolitjának van gyulladáscsökkentő hatása. Jelentős szerepe lehet a sejt redox homeosztázisának fenntartásában, mert biztosítja a GSH-GSSG egyensúlyát, növeli a  $\gamma$ -glutamil-cisztein szintáz expresszióját, mindemellett fokozza az antioxidáns hatású enzimek (SOD, CAT, GPx, GR) aktivitását és génexpresszióját. Ezek a melatonin direkt hatásai. Egy olyan kismolekulájú antioxidánsról beszélünk, mely lipofil tulajdonságánál fogva könnyen transzlokálódik a sejtmembrán belső oldalára, ezáltal egy olyan sejtorganellumban is ki tudja fejteni a korábban felsorolt hatásait, mely közvetlenül felelős lehet neurodegeneratív betegségek kialakulásáért és az öregedés folyamataért. Ebből következik, hogy ezen molekulának van egy indirekt hatása is, melynek lényege, hogy a mitokondrium belső membránjának stabilitásának

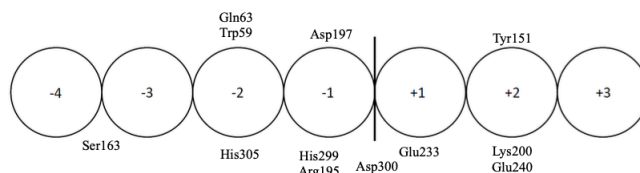
megőrzésével és az elektrontranszport lánc javításával képes az oxidatív stressz szabályozására. Ezen eredmények alapján nem meglepő, hogy a szájüregi egészség megőrzésében meghatározó szerepe van a melatoninnak, mert gátolja a biofilm képződését, ezáltal csökken a bakteriális növekedés a szájüregben, gátolja továbbá a virulencia faktorok kifejeződését, melyek stimulálják az IL-6 és IL-8 képződését, melyek fontos kemoatraktánsok a periodontális betegség kialakulásában.

### 3.6 $\alpha$ -AMILÁZOK SZERKEZETE

Az  $\alpha$ -amilázok a poliszacharidokban lévő  $\alpha$ 1-4 glikozidos kötéseit hidrolizálja. Jellemző rájuk a  $(\beta/\alpha)$ 8-hordó szerkezet mely katalitikus oldalláncokat tartalmaz. Négy erősen konzervált régió található, az primer aminosav szekvenciájukban. A konzervált régió tartalmazza az aktív helyet kialakító, valamint a TIM hordó állandóságát biztosító aminosavakat. A reakcióban három aminosav Glu233, Asp197, Asp300 vesz részt. A His, az Arg és a Tyr feladata, hogy az aktív helyre orientálják a szubsztrátot, és szerepet játszanak az átmeneti állapot kialakításában (Cote és mts.,1990; Gálné Remenyik, 2007). Ezen kívül sikerült azonosítani még egy konzervált régiót az  $\alpha$ -amiláz enzimekben (Janecek, 1995). Itt szintén megtalálható az aszpartát, ami  $\text{Ca}^{2+}$  ligandként működik. A humán nyálamiláz és a humán pankréász amiláz 97%-os, míg a sertés pankréász amiláz 91%-os aminosav homológiát mutat (Altschul és mts., 2005). Ezen nyálamilázok azonos inhibitorok jelenlétében azonos gátlás típusal jellemezhetők.

#### 3.6.1 Humán nyálamiláz (HSA)

A HSA egy 496 aminosavból felépülő fehérjelánc. Az embernél előforduló humán nyálamiláz (HSA) és a humán pankréász amiláz (HPA) kódoló gének tagjai, az 1. kromoszómán helyezkednek el (Ramasubbu és mts., 2003). A humán nyálamiláz enzim szerkezete az A, B és C doménből épül fel (Brzozowski és mts., 2000). Az A doménben elhelyezkedő V-alakú hasadék a szubsztrátkötő hely. A 6. ábrán a humán nyálamiláz enzim aktív centrumának sematikus képe látható. A katalitikus helytől (melyet az ábrán függőleges vonallal jelöl) balra (a nem redukáló vég felé) a glikon-kötő hely található, melyet -1, -2, -3, -4 számmal jelölnek.



6. ábra: A humán nyálamiláz enzim aktív centruma.

A katalitikus helytől jobbra (a redukáló vég felé) található az aglikon-kötő hely, mely a +1, +2, +3 jelölést kapta (Davies és mtsai., 1997). A humán nyálamiláz enzim -1, -2, -3 alhelyeinek betöltöttsége központi szerepet játszik a katalitikus aktivitásban.

Jellemző még egy  $\text{Cl}^-$  és egy  $\text{Ca}^{2+}$  ion jelenléte, melyek az enzim aktivitásában jelentős feladatot töltenek be (Ramasubbu és mts., 2003). A  $\text{Ca}^{2+}$  ion stabilizálja az enzim struktúráját (Vallee és mts., 1959), míg a  $\text{Cl}^-$  ion az enzim allosztérikus aktivátora (Numao és mts., 2008). A humán nyálamiláznak hidrolitikus aktivitása van, így a szájüregben megkezdődik a táplálék szénhidrát tartalmának bontása.

A humán nyálamiláz több kötőhellyel rendelkezik, melynek egyik része a katalízisért felel, másik része felelős lehet a bakteriális kötődés kialakulásáért. Ezen megállapítás fontos szerepet játszik a fogszuvasodás patogenezisének megértésében. Az  $\alpha$ -amiláz kötődése a dentális plakokban felszaporodó *S. mutans*okhoz elősegítheti az étkezésből származó keményítő hidrolízise során kialakuló cukrok bakteriális fermentációját és ezáltal a tejsav felszaporodását. Ez hozzájárul a fogzománc demineralizációjáért felelős plakkfolyadék kialakulásához. Így az  $\alpha$ -amiláz és a *S. mutans* között molekuláris szintű interakció, szinergizmus alakul ki, ahol a *S. mutans* baktérium kihasználja a gazdaszervezet enzimét azért, hogy energiát nyerjen anyagcsere folyamataihoz, miközben a gazdaszervezet kedvező feltételeket biztosít a mikroorganizmusok számára a szájüregben (Vacca-Smith és mts., 1996; Scannapieco és mts., 1995; Scannapieco és mts., 1989). Továbbá az  $\alpha$ -amiláz képes kapcsolódni a fogzománchoz és a hidroxipatithoz is (Yao és mts., 2001; Liang és mts., 1999).

#### *Új generációs szubsztrátok alkalmazása*

A legújabb szubsztrátokhoz tartozik a 2-klór-4-nitrofenil- $\beta$ -galaktopiranozil- $\alpha$ -D-glükopiranozil- $\alpha$ -1,4-glükopiranozid (GalG<sub>2</sub>-CNP) szubsztrát (Morishita és mts., 2000) a reakció során szabad kromofort (CNP) eredményezett mely 405 nm-en mérhető fotometriás módszerrel. Kinetikai vizsgálatok szempontjából fontos az olyan szubsztrát alkalmazása, amely a hidrolitikus hasítás után két terméket eredményez, és ezek nem bonthatók tovább az  $\alpha$ -amiláz enzimmal, így teljesül az egyensúly feltétele, mely leírható a Michaelis - Menten kinetikával.

### 3.7 HUMÁN NYÁLAMILÁZ INHIBITOROK

#### 3.7.1 A nyálamiláz inhibitorok jelentősége

A humán nyálamiláz inhibitoroknak jelentős szerepe van a fogszuvasodás prevenciójában. A keményítő bontását katalizáló  $\alpha$ -amiláz enzim képes kapcsolódni a szájüregben előforduló cariogén hatású mikroorganizmusokhoz, illetve a fogzománchoz (Scannapieco és mts., 1993; Scannapieco és mts., 1990). A fogak felszínén kialakuló dentális plakokban előforduló mikroorganizmusok és a keményítő bontásából származó egyszerű cukrok potenciálisan lehetőséget biztosítanak a baktériumok számára, hogy ezen szubsztrátokat az anyagcsere-folyamataikhoz felhasználják. A folyamat eredményeként tejsav keletkezik. A helyben keletkező demineralizáló hatású tejsav károsítja a fogzománcot, azaz cariogén attak éri, ami kritikus lépésnek tekinthető a fogszuvasodás kialakulásában.

Az utóbbi időben nagy az érdeklődés a humán nyálamilázaktivitást gátló farmakológiai szempontból aktív növényi komponensek iránt. A különböző növényi forrásból származó polifenolok erős inhibitorai a humán nyálamiláz enzimnek (Kandra és mts., 2004).

#### 3.7.2 Táplálékban előforduló természetes nyálamiláz inhibitorok

A növényekben előforduló  $\alpha$ -amiláz inhibitorok szerepe kettős. Az inhibitorok elsődleges funkciója a magvak védelme a mikroorganizmusokkal és a kártevőkkel szemben.

Az inhibitorok másodlagos hatása az úgynevezett endogén hatás (Henry és mts., 1992). Az  $\alpha$ -amiláz gátlók szintézise fontos az endospermium fejlődéséhez (Jarrett és mts., 1997). Az  $\alpha$ -amiláz aktív mediátora a mag fejlődésének és csírázásának (Mundy és mts., 1984). Csírázás során az  $\alpha$ -amiláz az endospermium keményítőt vízben oldódó mono- és diszacharidokká alakítják át, mert a csíranövény ebben a formában tudja hasznosítani a szénhidrátot és így tud új sejteket szintetizálni. Ezen inhibitorok gátolják az idő előtti csírázást az endogén enzim gátlásával (Yamagata és mts., 1998).

##### 3.7.2.1 Flavonoidok, mint természetes inhibitorok

McDougall és mts., 2005-ben arról számolt be, hogy a piros bogyós gyümölcsökből származó polifenolokban gazdag kivonatok alacsony koncentrációban jó inhibitorai az  $\alpha$ -amiláz enzimnek. Ez a tanulmány azt mutatja be, hogy a málnából származó

ellagitanninok (ET) az amiláz inhibíció legfontosabb aktív összetevői. Cheplick és mts., 2007-ben megjelent tanulmányában arról számol be, hogy az általa vizsgált piros málnafajták vizes és alkoholos kivonatának magasabb volt az  $\alpha$ -amiláz inhibíciós aktivitása, mint a sárga málnafajták vizes és alkoholos kivonatának. Ezen eredményekből következik, hogy a piros szín kifejeződéséért felelős antocianinok okozzák a megnövekedett  $\alpha$ -amiláz inhibíciós aktivitást.

Tadera és mts., 2006-ban megjelent tanulmányában a flavonoidok hat csoportjának (flavon, flavonol, flavanon, izoflavon, flavanol, és az antocianidin) inhibíciós aktivitását vizsgálta sertés hasnyálmirigy amilázon. Azt tapasztalta, hogy a hatásos inhibitor volt a myricetin, quercetin és a luteolin 0.38, 0.50 és 0.36 mM,  $IC_{50}$  érték, ahol ezen eredmények megegyeznek egy korábban Kim és mts., 2000-ben közölt eredményekkel. Tadera szerint a növekvő számú hidroxil csoportok jelenléte a B gyűrűn jelentősen megnöveli az inhibíciós aktivitást. Ezen kívül az eredmények értékelése során azt állapították meg, hogy a következő szerkezeti feltételek tovább fokozzák a flavonoidok inhibíciós aktivitását:

- A B-gyűrű kapcsolódása a C-gyűrű 3-as pozíciójához (genistein inhibíciója nagyobb, mint az apigeniné).
- A C-gyűrűn 2-es és 3-as pozíciók között kialakuló kettős kötés (flavon, izoflavon és a flavonol csoport inhibíciója nagyobb, mint a flavanon és a flavanol csoportok inhibíciója).
- Az A-gyűrű 5-ös pozíciójához kapcsolódó hidroxil csoportok (quercetin inhibíciója nagyobb mint a fisetiné) szintén meghatározóak.

Lo Piparo és mts., 2008-ban végzett vizsgálataiból megállapította, hogy a flavonoidok gátolják a humán nyál amilázaktivitását. Az általuk vizsgált 19 flavonoid közül négy flavonol és három flavon vegyületről sikerült igazolni inhibíciós aktivitást 100  $\mu$ M-nál kisebb koncentrációban. Továbbá igazolták az inhibíció szerkezeti feltételeit is. Kimutatták, hogy a luteolin, a myricetin és a quercetin hatékonyan gátolja a sertés hasnyálmirigy  $\alpha$ -amilázt, és a gátlás hatékonysága korrelál a hidroxil csoportok számával a B-gyűrűn. A modellezési vizsgálatok azt mutatták, hogy a nyálamiláz inhibitorok túlnyomórészt olyan módon kötődnek, amely lehetővé teszi az enzim és a hidroxil csoportok közötti H-kötések kialakulását a flavonoid vázban lévő B gyűrűben. Ezek a következők: a B-gyűrű R3' és R4' hidroxil csoportjai H-kötést alakítanak ki az Asp 197 és a Glu 233 karboxil csoportjával és az A-gyűrű R7 hidroxil csoportjával kapcsolódik

H-kötésen át a His 305. Továbbá feltételezik, hogy az AC-gyűrű és a Trp 59 indolgyűrűje közötti  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatások jönnek létre, amelyek tovább stabilizálják a kölcsönhatást. Ezen kötések kialakulása közül kiemelik az Asp 197 karboxil csoport és a B- gyűrű R4' hidroxil csoport között kialakuló H-kötés.

### 3.7.2.2 *Antocianinok, mint természetes inhibitorok*

Akcarachiyasit és mts., 2010-ben arról számol be, hogy az egyes cianidin származékok gátolják az  $\alpha$ -amilázaktivitást, valamint vizsgálták az egyes komponensek akarbóz szinergizmusát is. Azt tapasztalták, hogy a cianidin-3-glükózid hatásosabb alfa-amiláz inhibitor ( $IC_{50}$  0,30  $\pm$  0,01 mM) volt, mint a cianidin, cianidin-3-galaktozid, cianidin-3,5-diglükózid. Eközben a cianidin-3-galaktozid és a cianidin-3,5-diglükózid nem volt gátló hatással az  $\alpha$ -amilázra. Pozitív kontrollként használták az akarbózt mely a vizsgálati rendszerben  $0,12 \pm 0,04$  mM  $IC_{50}$ -értéket mutatott. Továbbá tanulmányozták a cianidin és glikozidjai, valamint az akarbóz szinergikus kölcsönhatását  $\alpha$ -glükózidáz és az  $\alpha$ -amiláz gátlásában. Az eredmények azt mutatják, hogy a cianidin-3-galaktozid, a cianidin-3-glükózid és a cianidin-3,5-diglükózid szinergikus hatást fejt ki és gátolja az  $\alpha$ -glükózidáz aktivitását alacsony akarbóz koncentráció mellett. Továbbá az  $\alpha$ -glükózidáz inhibíciója nem változott a cianidin és az akarbóz jelenlétében.

Az  $\alpha$ -amiláz gátlás szinergikus kölcsönhatás vizsgálata során azt tapasztalták, hogy alacsony akarbóz koncentráció mellett a cianidin és a cianidin-3-glükózid inhibíciója szignifikánsan növekedett (és a cianidin-3-glükózid inhibíciója nagyobb volt, mint az aglikoné), de a cianidin-3-galaktozid, és a cianidin-3,5-diglükózid esetében nem volt megfigyelhető szignifikáns hatás. Ha ezen molekulák szerkezetét összehasonlítjuk azt tapasztaljuk, hogy a 3-O-glükózid jelenléte fokozta az  $\alpha$ -amiláz inhibíciót. Ha a cianidin-3-glükózid és a cianidin-3-galaktozid szerkezetét is megvizsgáljuk azt tapasztaljuk, hogy a -glükózid és -galaktozid között a C4 pozícióban lévő hidroxil csoportok helyzete között van különbség, mely szintén meghatározó lehet a fokozta  $\alpha$ -amiláz inhibíció kialakulásában.

## **3.8 FOGSZUVASODÁS KIALAKULÁSÁT MEGHATÁROZÓ TÉNYEZŐK**

### **3.8.1 Fogszuvasodás-dental caries**

A fogszuvasodás egy a fogak kemény szövetének lokalizált pusztulásával járó multifaktoriális betegség, melyet a táplálkozásból származó szénhidrátok, bakteriális fermentációjából származó savas melléktermékek okoznak (Fejerskov és mts., 2003; Marsh és mts., 1999). A kóros állapot jellemzője a kemény szöveten megjelenő szuvas demineralizáció, továbbá ezen állapot elindítja a komplex biofilm mikrobiológiai átrendeződését és kialakul a dentális plakk, mely hatással van a nyáltermelésre és annak összetételére is. A fogszuvasodás kezdetben reverzibilis és megállítható folyamat akkor is, ha a dentin vagy zománc demineralizációja megtörténik, feltéve, hogy a dentális plakkot el lehet távolítani. A betegség kialakulhat a fogak korona és a gyökér részein, a tej- és maradandó fogakon, sima, valamint barázdált felületeken egyaránt.

Bár a fogszuvasodásra jellemző, hogy korai stádiumban reverzibilis folyamat, de gyakran előfordul, hogy megfelelő gondozás nélkül, a caries folyamatosan súlyosbodó krónikus betegséggé alakul, amely a fogak destrukciójához és elvesztéséhez vezet (Kidd és mts., 2004; Pitts, 2004; Featherstone, 2004).

A fogszuvasodás az egyik leggyakoribb szájüregi betegség mely megelőzhető ugyan, de bármely életkorban kialakulhat (Pitts, 2004; Featherstone, 2004; Fejerskov és mts., 2003).

### **3.8.2 A fogszuvasodás kialakulásának feltételei**

A fogszuvasodás keletkezését négy primer tényező határozza meg és ezek mindegyike elengedhetetlen feltétele a betegség kialakulásának (Newbrun, 1989).

- cariogén hatású mikroorganizmusok jelenléte a szájüregben
- finomított szénhidrátok fogyasztása, mely jó szubsztrátuma a fogszuvasodást okozó mikroorganizmusoknak
- a fogak élettani jellemzői. Ezen kívül a leginkább meghatározó
- az idő, mely a cariogén hatású savak fogzománcra történő tartózkodási idejére, valamint annak előfordulási gyakoriságára vonatkozik

A fogszuvasodás kialakulásában jelentős szerepe lehet a másodlagos tényezőknek is. Ebbe a csoportba tartozik a biológiai hatás (életkor, nem, genetikai adottság, fajtabeli és

családi körülmények, alkati és immunológiai jellegzetességek) valamint a viselkedésből eredő hatás, amely kapcsolatba hozható az egyén életmódjával, magatartásával (Nyárasdy és mts., 2009) például a rossz szájhygiéné; rossz táplálkozási szokások (finomított szénhidrátok gyakori fogyasztása). Továbbá a kisgyermekkorú fogszuvasodás kialakulásában jelentős szerepe van a csecsemőknél alkalmazott rossz etetési módszerek alkalmazásának (Fejerskov és mts., 2003; Featherstone és mts., 2003; Krol, 2003; Winn, 2001; Touger-Decker és mts., 2003).

Ezen kívül a másodlagos tényezőkhez sorolható az úgynevezett egyéb tényezők, mely a környezeti hatás, szociális- és gazdasági faktorokból áll.

A korábban ismertetett elsődleges és másodlagos tényezőkkel kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy az egyén képes a kockázati tényezők számát csökkenteni (pl.: átalakítja a táplálkozási szokásait, változtat a szájhygiénés magatartásán, rendszeresen jár fogászati ellenőrzésre) így csökken a fogszuvasodás kialakulásának a lehetősége tehát a fogszuvasodás megjelenése változhat az időben is.

### 3.8.3 A dentális plakk kialakulásának folyamata

A dentális plakk, olyan területeken alakul ki a szájüregben, melyekre jellemző, hogy nem öntisztulóak (gödröcskék, barázdák) vagy a mesterséges tisztítás számára nehezen hozzáférhetőek. A fogak letisztítása után legelőször a kis- és nagyörlők nehezen hozzáférhető felszínein jelennek meg a plakkok. A plakk képződése három fázisban történik. Először egy **szerzett pellicula** alakul ki. Ez egy fehérjékből és immunglobulinokból álló 1 µm vastag filmréteg, mely a nyálból képződik és minden felületet beborít, a fogmosás után azonnal. A pellicula elektrosztatikus és van der Waals-erőkkel kötődik a fog felszínéhez, elsősorban azok hidroxipatit foszfát csoportjához. A fogfelszínen kialakult pellicula védi a fogzománcot a savak közvetlen hozzáférésétől. A pellicula szerkezete fontos a fogak mikrobiális kolonizációjában, ez a folyamat az **iniciális kolonizáció**, melynek eredménye a biofilm. Máshogy megfogalmazva a baktériumok és más mikrobák közössége, amelyek gyakran egymáshoz, valamint a felülethez tapadva bevonatot hoznak létre, ez a biofilm. Ezen adherens sejtek extracelluláris mátrixban helyezkednek el. A biofilmet alkotó fajok többsége az ember normál mikroflórájának tagjai. A fogak felületén képződő biofilm, tulajdonképpen védelmet nyújt az exogén kórokozók kolonizációjával szemben. Előfordulhat, hogy egyes sejtek visszafordíthatatlanul kötődnek az aljzathoz, amely egy

speciális interakció eredménye, mely a baktérium-adhezin és ezek komplementer receptorai között jön létre a szubsztrát molekulák felszínén (Whittaker és mts., 1996).

A baktériumok tapadását követően egy kolonizációs szakasz következik, amely magába foglalja az extracelluláris mátrixmolekulák (általában poliszacharidok) szintézisét, a csatolt organizmusok szaporodását és/vagy más baktériumok (hasonló vagy különböző fajok) kötését a már megtapadt sejtekhez. A mátrixmolekulák szintézise döntő fontosságú a biofilm fejlődésének ezen szakaszában. Ezen folyamatokhoz nélkülözhetetlen az intercelluláris adhezin szintézise, mely elengedhetetlen a sejtek összerendezéséhez, továbbá lehetővé teszi a biofilm kialakulását (Cramton és mts., 1999). Amikor a fent vázolt feltételek teljesülnek, tulajdonképpen minden adott a mikroorganizmusok további növekedéséhez, ami az érett biofilmek jellegzetes sűrű bakteriális aggregátumainak képződését eredményezi. Az utóbbi struktúrák gyakran erős mechanikai és hidrodinamikai erőknek vannak kitéve, amelynek eredményeként a biofilm, de gyakran csak részei leválhatnak (Moore és mts., 2000). Az így levált szakaszok természetesen újra kötődnek az aljzathoz. Ez a folyamat a nagy területen történő kolonizálásnak egyik leghatékonyabb eszköze lehet. A biofilm képződése jelentősen megváltoztathatja a helyi környezeti feltételeket, mely jelentős ökológiai következményekkel jár. Egy fog felületére az aerob környezet jellemző, amely erős mechanikai nyíróerőknek van kitéve a rágás és a nyelv mozgása miatt. Ezen a felületen aerob vagy fakultatívan anaerob fajok tudnak kolonizálni, amelyek képesek kötődni a nyálban lévő glikoproteinekhez a fog felületén. Ilyen primer kolonizátorokként ismert mikroorganizmusok közé tartoznak a *Neisseria sp.* és *Streptococcus sp.* Ezek a szervezetek ezután megváltoztatják a helyi környezetet, pl. oxigén felhasználásával és savak előállításával, melyek anyagcsere folyamataik végtermékei. Ezzel olyan körülményeket teremtenek, melyek kedveznek az obligát anaeroboknak, amelyek a savakat szén- és energiaforrásként használhatják, mint a *Veillonella sp.* – ezek a fajok szekunder kolonizálóként ismertek. Az így létrejövő közösség megváltoztatja a növekvő biofilmen belüli ökológiai feltételeket és olyan környezetet hoz létre, amely más ökológiai igényrel rendelkező baktériumok számára is optimális lehet. Ezenkívül a nyálban jelen lévő oxigén és tápanyagok bejutását a növekvő bakteriális aggregátum gátolja, így gradiensek alakulnak ki a biofilmen belül, ezáltal több mikroélelőhely fog generálódni, lehetővé téve a nagyon eltérő táplálkozási és környezeti igényű fajok megjelenését. Az összetett közösség tagjai között antagonista és szinergista végül homeosztatisz kölcsönhatás alakul ki, és így egy stabil "klimax-társulás" jön létre (Wilson, 2001). A kialakult mikrobiális homeosztázison belül kölcsönhatások jönnek

létre. Ilyen kölcsönhatások közé tartoznak pl: a verseny a tápanyagokért, a bakteriocin termelés és a koaggregáció. Ez a "mikrobiális homeosztázis" azonban attól függ, hogy a külső környezet állandó marad-e. Miközben ez a biofilm főként a *Streptococcusokból* és az *Actinomyces spp.*-ből áll, sok más faj is jelen lehet, és bizonyos körülmények között, ezek a fajok elszaporodhatnak, olyan biofilmet eredményezve, amely nem tekinthető kompatibilisnek az egészséggel (Kolenbrander, 2000; Marsh és mts., 1995). Ezek a patogén hatású biofilmek/ dentális plakkok olyan betegségeket idéznek elő, mint a fogszuvasodás és a fogínygyulladás, valamint fogágybetegség, amelyek a humán társadalom leggyakoribb fertőzései közé tartoznak (Rosan és mts., 2000). Ha az egyén nagy mennyiségű cukrot tartalmazó élelmiszert vagy italt fogyaszt, akkor a biofilmet hatalmas mennyiségű, de könnyen metabolizálható szénhidrát éri, amelyet a biofilmben jelenlévő mikroorganizmusok metabolizálnak savas végtermékekké. Ez olyan környezetet teremt, amely kedvez a savas kémhatást kedvelő, fakultatív anaerobok például *Streptococcus mutans* és *Lactobacillus spp.* elszaporodásának. Ezzel kialakul a dentális plakk. Ha ezen fajok dominálnak a szájüreg mikrobiális közösségében és csökkentik a plakk pH-értékét, előidézhetik a fogzománc rétegének feloldódását (Marsh és mts., 1997). Ez a folyamat cariest eredményez. A szájüregi fertőzések másik fő csoportját képviselik a fogágybetegségek. Ha a fog és a fogak közti résekben kialakul a dentális plakk és azt nem távolítják el, folyamatos gyulladásos reakciót eredményez a gazdaszervezetben, amely a sulcushámmal kapcsolatba kerülve, sérüléses gyulladásos exudátum fokozott szekrécióját eredményezi. A periodontopatogének (*Porphyromonas gingivalis*) fokozott proliferációja megváltoztatja a biofilm közösséget, és a Gram-negatív anaerobok dominálnak, amely szintén a dentális plakk kialakulását eredményezi. Egy ilyen közösség képes arra, hogy a gazdaszervezetet olyan gyulladásos mediátorok (például citokinek és prosztaglandinok) túltermelésére indukálja, amelyek a szövetek lebontását (azaz önpusztítását) eredményezik (Wilson és mts., 1996). A foglepedék mikroorganizmusokat, PMN (polymorfonukleáris) -leukocitákat, makrofágokat, hámsejteket, valamint a mikroorganizmusok számára nélkülözhetetlen szubsztrátokat tartalmaz. A foglepedék egy halványsárga, krémszínű lerakódás, mely olyan erősen tapad, hogy csak intenzív és rendszeres mechanikus tisztítással távolítható el, és mindig olyan helyeken tapad meg, ahol a mechanikus tisztítás nem érvényesül.

### 3.8.4 A dentális plakk kapcsolata a fogszuvasodással

Kezdetben a foglepedék alacsony patogenitású aerob fajokból áll, később viszont az érés folyamán a lepedék összetétele anaerobbá válik, melyre jellemző, hogy gyorsan metabolizálja a rendelkezésre álló szénhidrátokat, melyek glükóz, fruktóz, szacharóz vagy más mono- és diszacharidok lehetnek. A fermentáció során tejsavat, ecetsavat, hangyasavat és propionsavat állítanak elő jelentős, időben elhúzódó pH csökkenést eredményezve. Bár az összes fermentálható szénhidrát cariogén hatású, mégis a cukor köthető leginkább a caries kialakulásához (Kidd és mts., 2005). A foglepedékre jellemző a pH-ingadozása, melynek eredményeként a fogak felszínén demineralizációs folyamatok játszódnak le, mely fokozott kalcium, foszfát és karbonát felszabadulását generálja a fogakból, azaz a fogak ásványianyag-tartalmának csökkenését eredményezi. Ugyanakkor, ha az 5,0 és 5,5 közötti pH-t sikerül megszüntetni, és kialakul a szájüregre jellemző fiziológiás pH, akkor lezajlik a remineralizáció folyamata, mely az ásványianyag-tartalom azaz a kalcium, foszfát és fluorid beépülését jelenti. Ebből következik, hogy a fogak felszínén állandó, de- és remineralizációs folyamatok játszódnak le, melynek kialakulásának gyakoriságát nagyban meghatározza a szájüregre jellemző foglepedék pH-ja. Természetesen az egyszeri, rövid ideig tartó pH csökkenés még nem okoz jelentős elváltozást, a fogak szöveteiben. Viszont a gyakran ismétlődő vagy hosszú ideig tartó szénhidrát kínálat, amely egy tartós alacsony pH-jú környezetet eredményez, olyan fokú demineralizációt indíthat el, mely a fogak szöveteinek szerkezetét irreverzibilis módon destruálja, és végső soron üreges, szuvas lézió alakul ki. Ezt követően a szuvas fogakban megjelennek a cariogén hatásukról ismert *Streptococcus* és *Lactobacillus* fajok, viszont, ha a fogak helyreállítása megtörténik, az elsődleges kolonizálók, a fogszuvasodás kifejlődése szempontjából kevésbé jelentős, alacsony patogenitású törzsek azonosíthatók, úgy mint, a *S. mitis* és a *S. sanguis* (Nyárasdy és mts., 2009). 2010-ben vezették be az „ökológiai plakk hipotézis” fogalmát, mely szerint a szájüregre jellemző fiziológiás körülmények megváltozásában, azaz a patológias folyamatok kialakulásában jelentős szerepet játszanak a szájüreg állapotát befolyásoló környezeti feltételek (Marsh, 1994; Marsh, 2003). Ezen környezeti feltételekhez tartozik a fermentálható szénhidrátok fokozódó bevitele, a szájhigiéniai szokások, valamint a fluorid expozíció megváltozása, továbbá a nyál viszkozitásának növekedése. Ezen tényezők együtt eredményezik az alacsony pH-jú időszakok meghosszabodását a szájüregben, mely elősegíti a savas környezettel szemben toleranciát mutató baktériumfajok például a *Streptococcus mutans* fokozott elszaporodását (Marsh, 2003).

### 3.8.5 A *Streptococcus mutans* szerepe a caries kialakulásában

A mikroorganizmusok kulcsszerepet játszanak a fogszuvasodás kialakulásában (Miller, 1890). Miller a fogszuvasodás elsődleges tényezőjének a kemoparazita elméletet feltételezte, olyan savakkal, amelyeket a baktériumok a cukor erjesztésével állítanak elő. A mai napig ez a korai tanulmány képezi a fogszuvasodás megértésének alapját. A 60-as évek végétől klinikai vizsgálatok széles köre mutatott rá a mutáns-streptococcusok jelenléte és a fogszuvasodás előfordulása közötti kapcsolatra (Edwardsson, 1968; Fitzgerald, 1968; Bowden és mts., 1978). Számos tanulmány arról számol be, hogy összefüggés van, a szájüregi mikroflóra, az étrend (a fermentálható cukrok nagymennyiségű és gyakori fogyasztása) és a fogszuvasodás (Folke és mts., 1972; Gawronski és mts., 1975; Skinner és mts., 1984) között. Ezeknek az adatoknak köszönhetően a *S. mutans*-ra irányuló kutatások fokozatosan intenzívebbé váltak és a *S. mutans*-t „odontopatogénként” azonosították (Loesche és mts., 1986). Ezen mikroorganizmusok biokémiai jellemzői igazolták cariogén szerepüket, valamint, hogy a *S. mutans* glikolitikus életmódra adaptálódott (de Soet és mts., 2000) továbbá azt a korábbi felvetést is megerősítette, hogy a *S. mutans* anaerob körülmények között képes a laktát előállítására (Bradshaw és mts., 1989, 1998). A *S. mutans* nagyfokú toleranciát mutat a savas környezetre. Figyelemre méltó a DNS-javító mechanizmusa, az intracelluláris savasodás tágabb toleranciája jellemző, továbbá megfigyelték a  $H^+$  - ATPázok nagyobb aktivitását alacsony pH-n és számos egyéb mechanizmust (Matsui és mts., 2010). Ezenkívül a *S. mutans* patogenitásában az extracelluláris poliszacharidok (EPS) (Dibdin és mts., 1988) termelése fontos szerepet tölthet be. Bizonyították, hogy a *S. mutans*, ha az anyagcsere folyamataihoz cukrot használ nagyobb mértékben képes túlélni és növekedni, (Bradshaw és mts., 1989, 1998) még akkor is, ha a pH érték alacsony. Így ezek az eredmények megmagyarázták, hogy azonos körülmények között a nagy koncentrációjú és/vagy gyakori cukorbevitel esetén a *S. mutans* előfordulása rendszeresen gyakoribb volt más mikroorganizmusokhoz képest. Ezen faj genomjának vizsgálata igazolta a baktérium adaptációját a szénhidrátban dús orális környezet nyújtotta ökológiai niche-hez. Feltételezik, hogy a szénhidrát felvevő rendszerekben szerepet játszó gének, a savtűrő mechanizmusok, valamint a glükánkötés (Russell, 2008), együtt járulnak hozzá a *S. mutans* versenyképességéhez.

### **3.9 A FOGSZUVASODÁS PREVENCIÓS LEHETŐSÉGEI**

A fogszuvasodás megelőzésében fontos szerepet játszik a helyes preventív magatartás. A főétkezések száma három, ezenkívül tízórai és az uzsonna elfogadható. Az étkezések után fogat kell mosni. A cukorfelvétel a táplálékfelvétel 10%-át nem haladhatja meg. Növelni kell a rost tartalmú táplálék arányát. Kerülni kell a magas cukor tartalmú, erősen tapadó konzisztenciájú ételek fogyasztását, mert a fogak barázdáiban és gödröcskéiben megtapadnak sok ideig tartózkodnak a fogfelszínen és így cariogén attack-ot idéznek elő.

#### **3.9.1 Fluoridok szerepe a prevencióban**

A fluorid jelentős caries preventív hatással rendelkezik, mert a fogszuvasodás korai stádiumában a fluorid beépülésével csökkenthető a fogzománc oldhatósága. A fluorid úgy fejti ki hatását, hogy erősíti a fogzománc hidroxí apatit kristályszerkezetét, valamint elősegíti a remineralizációt. Ezen kívül hatással van a plakokban előforduló baktériumokra, mert elnyomja a magas patogenitású cariogén flórát, valamint gátolja a fehérjék, baktériumok adszorpcióját a fogzománc felszínén. A fluorid alkalmazható szisztémásan az egyén közreműködése révén, az egész lakosságra kiterjedően ide tartozik az ivóvíz fluorid dúsítása: 1mg/L fluorid adagolása mellett 50%-kal csökkent az DMF-index. Lehet univerzális, de választható is, ha a sót vagy tejet dúsítják fluoriddal és ezt a csomagoláson feltüntetik. Alkalmazható a fluorid tabletta ott, ahol a víz fluorid tartalma alacsony. Professzionális módszerekhez tartozik, a fluorid tartalmú lakk, ecsetelő, zselék használata, melyek vagy fogorvosi kezelésekhez kötöttek vagy az alacsonyabb koncentrációjúak gyógyszerértékesítési forgalomban is kaphatóak (Nyárasdy és mts., 2009).

#### **3.9.2 Szájhigiéné szerepe a prevencióban**

Az itt megemlített eszközökre jellemző, hogy rendszeres használatuk során hatásosan távolítható el a foglepedék. Ide tartoznak a hagyományos fogkefék, melyek eltérő fejformákkal és nyélkiképzéssel jelennek meg a kereskedelmi forgalomban. Továbbá az interdentalis fogkefék, illetve megjelentek a latex csíkot tartalmazó polírozó hatású fogkefék is. Elektromos fogkefék szintén változó fej kialakítással érhetőek el és jellemző rájuk az oszcilláló-rotációs mozgás. Ezenkívül ismertek a járulékos tisztító eszközök: fogselyem, szuperfloss a híd pótlás eredményes tisztítására, fogköztisztító kefe, interdentalis kefe. Mechanikai tisztításra alkalmas eszközök a különböző fogkrémek,

szájvizek. A fogkrém alapanyaga: abrazív- és felületaktív anyagok, oldószerek, stabilizáló anyagok, ízesítő- és illatosító anyagok, gyógyszerek és kémiai anyagok. Fognyaki érzékenységre alkalmazzák a szerves fluor vegyületet, valamint a stroncium-kloridot, mert ezen anyagok hatásosan zárják a dentincsatornákat (Nyárasdy és mts., 2009).

### **3.9.3 A barázdazárás szerepe a prevencióban**

A barázdazárás egy noninvazív, fájdalommentes eljárás, amely során a fogak felszínén a fogszuvasodás kialakulásának szempontjából kedvezőtlen barázdákat speciális anyaggal lezárják. Erre azért van szükség, mert a mély barázdákat nehéz tisztítani és ezeken a területeken tartós cariogén attack léphet fel, meggyengítve a fogzománcot és az idő múlásával caries alakulhat ki (Nyárasdy és mts., 2009).

### **3.9.4 Táplálkozás szerepe a prevencióban**

A növényi rostokban dús táplálkozás stimulálja a nyáleválasztást, valamint a növényi anyagok biológiailag aktív komponensei anticariogén hatással rendelkeznek. Ide sorolhatók a tanninok, flavonoidok, antocianinok, melyek cariosztatikus hatásúak. Egy ételcsoport cariogén hatását meghatározza annak összetétele és konzisztenciája, fizikai állaga. A szénhidrátban (poli-, di- és monoszacharid) dús ételek fogyasztása és fogyasztásának gyakorisága szintén meghatározó a fogszuvasodás kialakulása szempontjából. Ha a glükóz, szacharóz és fruktóz helyett xilitet fogyasztunk, akkor csökken a fogszuvasodás kialakulásának kockázata. A xilitre jellemző, hogy bomlása lassú és bomlása során kevesebb tejsav keletkezik, gátolja az extracelluláris poliszacharid szintézisét, csökkenti a dentális plakk tapadóképességét, valamint a mikroorganizmusok anyagcseréje nem adaptálódik a xillithez (Nyárasdy és mts., 2009).

#### ***3.9.4.1 A rágógumi szerepe a fogszuvasodás kialakulásának prevenciójában***

A rágógumi fontos szerepet játszik a cukrázsiiparban, (Valduga és mts., 2012) rendkívül népszerű, szinte valamennyi korosztály által keresett termék. A 2014-es adatok szerint világszerte 25 milliárd dollár értékben forgalmaztak rágógumit. Az Egyesült Államok egy főre jutó éves rágógumi fogyasztása 160-180 csomagnak felel meg. (Konar és mts., 2016). Napjainkban a forgalomban lévő rágógumikat négy csoportba sorolhatjuk: vannak a cukor tartalmú-, cukor mentes-, bevonatos-, valamint a gyógyszeres rágógumik.

A rágógumi, mind gusztatórikus mind masztatorikus ingereken keresztül képes serkenti a nyálmirigyek szekrécióját, mely fokozott stimulált nyáltermelést eredményez, növelve ezzel a szervezet ellenállóképességét. A stimulált nyálban fokozott mértékben szekretálódik a kalcium, foszfát és bikarbonát, melyek rendkívül fontos szerepet játszanak a szájüreg fiziológiás állapotának fenntartásában. A foszfát és a kalcium szerepet játszik a fogzománc remineralizációjában. Továbbá a kalcium egyrésze prolin tartalmú fehérjékhez kötődik, valamint a statherinhez, tovább fokozva ezzel a szervezet ellenállóképességét, mert nagy affinitással kötődnek a fogzománc felszínéhez. Ez a dentális pellicula, mely közvetlen védelmet biztosít a fogak számára a savakkal szemben és védelmet jelenthet az abrázícióval szemben is (Kidd, 2005). Napjaink rossz táplálkozási szokása, nagy mennyiségű finomított szénhidrát fogyasztása csökkenti a szájüreg pH-ját, mely demineralizációs folyamatokat generál a fogzománcra. A stimulált nyálban megnövekedett bikarbonát felelős a fiziológiás pH kialakulásáért, mert a fogzománc remineralizációja csak 5,5-ös pH felett megy végbe. Természetesen egyéb összetevői is vannak a nyálnak, melyek szintén jelentős szerepet játszanak a szájüreg védelmében. Ide tartoznak az antivirális, antibakteriális, valamint antifungális hatású mucinok, immunglobulinok, histatinok, továbbá a lizozim, laktoperoxidáz és az  $\alpha$ -amiláz (Kidd, 2005).

Az aktív rágásra ösztönző készítmények ideális szájápolási termékek. A rágás általában olyan típusú szivattyúzási hatást fejt ki, amely hatékonyan préseli a biológiailag aktív nyálösszetevőket a fogak mélyedéseibe. Napjainkban a kereskedelmi forgalomban kapható rágógumik jó része cukormentes. Ezzel egy olyan termék került be a kereskedelmi forgalomba, mely fokozza a nyáltermelést, a pufferkapacitást, valamint fokozza a fogzománc remineralizációját, ezáltal csökkenti a fogszuvasodás kialakulásának a kockázatát. A cukor bizonyítottan cariogén hatású. Ezért cukoralkoholokkal, xilittel helyettesítették a cukrot a legtöbb szájápolási termékekben azért, hogy a fogszuvasodás kialakulásának kockázatát csökkentsék. Számos tanulmány szól arról, hogy a xilit tartalmú rágógumi csökkenti a *S. mutans* és a *Lactobacillus sp.* számát, továbbá csökkenti a plakk tömegét és tapadását is, valamint szelektív hatást fejt ki a plakk metabolizmusra. Xilit jelenlétében a *S. mutans* tejsav termelése csökkenő tendenciát mutat. Ennek az lehet az oka, hogy a *S. mutans* metabolizmusa során a glikolitikus útvonalat preferálja, de a poliolo köztük a xilit szénváza nem lép be közvetlenül a glikolízisbe. Scheinin és mts., 1975; Mäkinen és mts., 1995-ben megjelent tanulmányában arról számol be, hogy azok a rágógumik melyek poliolt tartalmaznak nem

okoznak savas attack-ot. Így ezen rágógumik fogyasztása fokozza a remineralizációt az eredményeket *in vitro* (Steinberg és mts., 1992; Miake és Yanagisawa, 2000) és *in vivo* módon is igazolták. A xilit növeli a plakk kalcium szintjét, mely oldható formában lesz jelen és rendelkezésre áll a remineralizációs folyamatokban (Mäkinen, 1989).

A rágógumi korábban felsorolt jótékony hatásaiból következik, hogy új alternatív felhasználási utakat nyithat meg számunkra. A rágógumi bizonyos esetekben stabil vivőanyagként is tekinthető akkor, ha lassú hatóanyag leadással szeretnénk aktív vegyületeket a szájüregbe juttatni, amelyek a nyálban gyorsan feloldódnak és ott helyileg fejtik ki hatásukat. Ezek a gyógyszeres rágógumik, amelyek nem csak farmakológiai ágenseket tartalmazhatnak, hanem bioaktív komponenseket is. Ebben az esetben rágógumi, mint hatóanyag leadó rendszer szerepel. A rágóban lévő gyógyszerek vagy biológiailag aktív komponensek a hatóanyag szerepét töltik be, mely a rágás során szabályozott módon szabadulnak fel a rágógumiból (Maggi és mts., 2013). Így ezen rágógumik alkalmasak lehetnek fogászati rendellenességek kezelésére, a nikotin függés csökkentésére, valamint az étvágy, stressz és a hangulatváltozások szabályozására (Deshpande és mts., 2008; Hearty és mts., 2014; Hetherington és mts., 2011; Ribelles és mts 2010; Smith és mts., 2012). Ráadásul nem szabad elfelejteni, hogy a rágógumi nagyon népszerű termék, melyre jellemző, hogy a társadalom által széles körben elfogadott, tulajdonképpen rutinszerű alkalmazásáról beszélünk, továbbá mivel a hatóanyag felszabadulása ellenőrizhető, a lokális szájüregi betegségek kezelésére alkalmazott gyógyszerek (Yang és mts., 2004) valamint biológiailag aktív komponensek hordozására hatékonyak lehetnek. Ez azt jelenti, hogy a rágógumi, bátran alkalmazható, mint vonzó és hatékony alternatív hatóanyag-leadó rendszer.

A gyógyszeres rágógumi terápiás célokra a következő esetekben alkalmas lehet a középfülgyulladás kezelésére, nikotin függőségre, fájdalom- és hányinger csökkentésére, továbbá orálisan adagolható antifungális hatású készítmények adagolására, valamint a fogszuvasodás megelőzésében is hatásos alternatív megoldást kínál. A rágógumiból fokozatosan kioldódnak a gyógyszer molekulák vagy a biológiailag aktív vegyületek, és a szájüreg nyálkahártyáján keresztül abszorbeálódnak, azaz egy meghatározott időtartamig folyamatos a hatóanyag felszabadulás, amely javítja a terápiás hatást (Maggi és mts., 2013). Egyes hatóanyagok biohasznosíthatósága és eloszlása a szövetekben a rágógumi előnyeit mutatta (Yang és mts., 2004). A fogszuvasodás kockázatának csökkentésének egyik módja volt, hogy a rágógumi cukor tartalmát xilitre cserélték. A fluorid tartalmú rágógumik akkor alkalmazhatóak, ha a szájüregben alacsony a fluorid

koncentráció. Hatására megnövekszik a nyál fluoridszintje és ezzel egyidejűleg stimulálható a nyál áramlási sebessége, ami elősegíti a remineralizációt, továbbá a cariogén hatású szubsztrátok kiürülését a szájüregből, valamint a nyál- és plakk pH-értékének emelkedését (Itthagarun és mts., 1997). A fluoridtartalmú rágógumik használata óvatosságot igényel a fluorozis elkerülése érdekében.

Egy másik alternatív megoldás lehet a biológiailag aktív komponenseket tartalmazó rágógumik alkalmazása. Yang és mts 2004-ban megjelent tanulmánya beszámol egy in vivo kísérletről, ahol egy specifikus bevonási módszert alkalmaztak a catechint tartalmazó rágógumi bevonásához, azért, hogy a catechin terápiás koncentrációja biztosítva legyen rágási periódus (kb. 30-40 perc) alatt. A kitin egy poliszacharid, az N-acetil-D-glükózamin, amely a rovarok, rákok, garnélák és homárok külső vázában található, valamint más gerinctelen szervezet belső struktúráiban. A kitin szerepet játszik a kitozán termelésében, amely aktivitást mutatott *S. mutans* ellen (Virga és mts., 2002; Sano és mts., 2003 Bae és mts., 2006), valamint gátolta a *S. mutans* kötődését (Tarsi és mts., 1997; Sano és mts., 2003). Kimutatták, hogy rágógumiként anticaries hatásokkal rendelkezik (Shibasaki és mts., 1994; Hayashi és mts., 2007 a és b). Az eredmények arra engednek következtetni, hogy a kitozán tartalmú rágógumi képes csökkenteni a fogszuvasodás kialakulásának kockázatát.

## **4. ANYAG ÉS MÓDSZER**

### **4.1 MEGGYFAJTÁK SZÁRMAZÁSA**

Az általunk vizsgált meggyfajtákat az Újfehértói Gyümölcstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Nonprofit Közhasznú Kft. bocsátotta rendelkezésünkre, bizonyos fajtákat pedig, a Pallagi Kertészeti Kísérleti Teleptől kaptunk. A minták biológiai érettség állapotában kerültek szedésre, hűtve szállították a Debreceni Egyetemre, ahol feldolgozásig tároltuk -20°C-on, sötét helyen. Vizsgálatainkat több éven át végeztük, jelen dolgozatban csak az az öt fajta ('Cigánymeggy 59', 'VN1', 'Debreceni bőtermő', 'Kántorjánosi', 'A') szerepel melyekre jellemző, hogy a sokéves mérés során, stabilan jellemző rájuk a fő antocianin komponensek közel azonos koncentrációja. A beltartalmi paraméterek jellemzésére alkalmazott statisztikai próbák átlaga és szórása, három ismételt mintavételből származó mintákból, három ismétlésben mért eredményekből származik.

### **4.2 FELHASZNÁLT VEGYSZEREK**

Kísérleteinkhez HPLC, valamint analitikai tisztaságú oldószereket és vegyszereket alkalmaztunk, a tisztítási módszerhez Supelclean™ ENVI™-18, 3 mL Tubes No. 57063 (Sigma) használtunk.

#### **4.2.1 Standardok**

Kuromanin chloride (Cyanidin-3-glucoside chloride), AppliChem

Oenin chloride (Malvidin-3-glucoside chloride), AppliChem

Malvidin chloride (Malvidin-3,5-diglucoside chloride), AppliChem

Keracyanin chloride (Cyanidin-3-ruthinoside chloride), Fluka

Melatonin, Alfa Aesar

#### **4.2.2 Vegyszerek az antioxidáns kapacitás méréshez**

ACW: R1: ACW hígító oldat, R2: reakció puffer, R3: fotoszenzitív és detektáló reagens, R4: aszkorbinsav standard

ACL: R1: ACL hígító oldat (metanol), R2: reakció puffer, R3: fotoszenzitív és detektáló reagens, R4: trolox standard

### 4.2.3 Kinetikai mérésre használt vegyszerek

Szubsztrát: 2-Chloro-4-nitrophenyl-4-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-maltoside (GalG<sub>2</sub>CNP, SORACHIM S.A., Lausanne, Switzerland)

Enzim: Modell enzimként az emberi nyálból (IXA típusú SIGMA) származó  $\alpha$ -amilázt (EC 3.2.1.1.) alkalmaztuk. Az enzim tisztaságát ellenőriztük SDS-PAGE-vel. Nem figyeltünk meg  $\alpha$ - és /vagy  $\beta$ -glükózidáz aktivitást.

Inhibitorok: HPLC tisztaságú standardok, Cyanidin-3-glucoside chloride (AppliChem), Malvidin-3-glucoside chloride (AppliChem), Malvidin-3,5-diglucoside chloride (AppliChem), Cyanidin-3-ruthinoside chloride (Fluka). Valamint a 'Cigánymeggy 59', 'VN1', 'A', 'Debreceni bőtermő' és a 'Kántorjánosi' fajtákból készített meggykivonatok.

## 4.3 AZ *IN VITRO* VIZSGÁLAT SORÁN ALKALMAZOTT MÉRÉSI MÓDSZEREK

### 4.3.1 Minta előkészítés szárazanyagtartalom mérésre

A meggy gyümölcsöt aprítottuk, majd -20°C-on fagyasztottuk 8 órán keresztül. A liofilizáláshoz, CHRIST ALPHA 1-4 LSC készüléket használtunk, -20°C-on, 1,030 mbar nyomáson, 16 órán át. A liofilizálás lépését háromszor ismételtük. A liofilizált mintákat dörzsmozsárban porítottuk, majd a bemért tömeg ismeretében kiszámoltuk az egyes fajták szárazanyagtartalmát.

### 4.3.2 Extrakciós eljárások és UHPLC analízis

Az áztatás folyamatát választottuk az extrakciós eljárások közül, melyet folyamatosan kevertettünk. Az áztatás előnye, hogy azonos kiindulási anyagok esetén azonos hatóanyag-tartalmú extraktumot kapunk.

#### *Antocianin extrakció és UHPLC analízis*

A vizsgálatban szereplő valamennyi mintát homogenizáltuk Braun Multiprimer (300 Watt) készülékkel. Az extrakciós elegy metanol: víz: ecetsav volt, melyet 25:24:1 arányban alkalmaztunk. A kevertetést mágneses keverővel (MSH 300, BIOSAN) 60 percen keresztül szobahőmérsékleten végeztük. A kivonatokat szűrés után, 40°C-on BÜCHI ROTAVAPOR R-210 (Switzerland) bepárlóval bepároltuk. A bepárolt mintákat újra oldatba vittük 3%-os hangyasavas oldattal. Majd az antocianinok könnyebb szétválasztása érdekében a meggy extraktumok frakcionálását, előkondicionálását

Supelclean ENVI-18 SPE oszlopokkal végeztük el (Kim és mts., 2005). Tisztítás után az antocianinban dús frakciót bepároltuk.

A mintákat CromasterUltraRs ultra nagynyomású folyadékkromatográfiával diódasoros detektorral automata mintavevővel és Agilent OpenLAB softwarrel vizsgáltuk, ahol az állófázis: Phenomenex Kinetex 2,6  $\mu$ , XB.C18, 100A, 100 x 4.6 mm, a mozgó fázis: A pumpán metanol, a B pumpán 3% hangyasav volt (Mozetic és mts., 2002. A detektálást  $\lambda=535$  nm-n mértük és gradiens elúciót alkalmaztunk 0 perc: 15:85, 25 perc: 30:70, 30 perc: 40:60, 40 perc: 50:50. Az egyes komponensek azonosítása HPLC tisztaságú standardokkal történt: Cyanidin-3-glucoside chloride (AppliChem), Malvidin-3-glucoside chloride (AppliChem), Malvidin-3,5-diglucoside chloride (AppliChem), Cyanidin-3-ruthinoside chloride (Fluka).

A minták mérése során három párhuzamos mérést végeztünk. Az minták antocianin koncentrációját mg/100g értékben friss tömegre vonatkoztatva adtuk meg.

#### *Melatonin extrakció és HPLC analízis*

A vizsgálatban szereplő valamennyi mintát homogenizáltuk Braun Multiprimer (300 Watt) készülékkel. Az extrakciós elegy 600 ml kloroformot és 300  $\mu$ l 0,8 M-os  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -ot tartalmazott. A kevertetést mágneses keverővel (MSH 300, BIOSAN) 40 percen keresztül szobahőmérsékleten végeztük. A kevertetés sötétben történt a molekula fényérzékenysége miatt (Reiter, és mts., 2005, Remenyik által módosítva nem publikált 2012). Ezt követően durva szűrést alkalmaztunk, majd választótölcséren elválasztjuk a két fázist. A szerves fázishoz 2 kanál szárított magnézium-szulfátot adagoltunk. A szerves fázist bepároltuk, Büchi Rotavapor R-210/215 (Switzerland) vákuumbepárlóval 40°C -os vízfürdőn, az extraktumot szárazra pároltuk. A mintákat Hitachi LaChrom nagynyomású folyadékkromatográfiával diódasoros detektorral L-7455 analizáltuk, automata mintavevővel L-7250, interface L-7000, pumpa L-7100 és HPLC rendszerhez Manager szoftverrel vizsgáltuk, ahol az állófázis: Chromolith RP-18e 100 x 4,6 mm és a mozgó fázis: A pumpán 18% acetonitril, a B pumpán Sorensen puffer volt (Burkhardt, és mts., 2001). A detektálást  $\lambda=275$  nm-n mértük és izokratikus elúciót alkalmaztunk. A melatonin azonosítása HPLC tisztaságú Melatonin standarddal történt. (Alfa Aesar) A minták mérése során három párhuzamos mérést végeztünk. A minták melatonin koncentrációját ng/100g értékben friss és száraz tömegre vonatkoztatva adtuk meg.

#### 4.3.3 Antocianinok meghatározása pH differenciál módszerrel

A homogenizált mintákból 2 g-nyi mennyiséget 10 ml 2% (V/V) -os HCl-Etanol oldattal extraháltuk az antocianinokat. Készítettünk egy pH=1,0-es puffert, mely 67 ml HCl-oldatból és 25 ml KCl-oldatból állt. A KCl oldatot a következő módon készítettük: 1,49 g KCl-ot 100 ml desztillált vízben oldottunk. A HCl oldat a következőkből állt: 1,7 ml tömény HCl-ot hígítottunk 100 ml desztillált vízzel. A pH=4,5-ös puffer készítése: 1,64 g Na-acetátot oldunk 100 ml desztillált vízben, majd annyi tömény HCl-at adtunk hozzá, hogy az oldat pH=4,5. A mérést  $\lambda=530$  és 700 nm-en (Amersham Biosciences Ultraspec 2100 pro típusú spektrofotométeren) szimultán mértük. A mérés során 3600  $\mu$ l pufferhez 400  $\mu$ l mintát adunk (Lee és mts., 2005). A minták mérése során három párhuzamos mérést végeztünk. A minták antocianin koncentráció értékét mg cianidin-3-glükozid ekvivalens /100g értékben friss és száraz tömegre vonatkoztatva is megadtuk. A következő képlettel számoltunk:

$$\Delta A = (A_{530\text{nm}} \text{ pH}1,0 - A_{700\text{nm}} \text{ pH}1,0) - (A_{530\text{nm}} \text{ pH}4,5 - A_{700\text{nm}} \text{ pH}4,5)$$

$$\% \left( \frac{m}{m} \right) = \frac{\Delta A}{\epsilon L} MD \frac{V}{m} 100$$

A: Abszorbancia

$\epsilon$ : 26900

L: kuvetta hossza (1 cm)

M: Moláris tömeg (449,2 g/mol)

D: Hígítás

V: minta térfogata (ml)

m: minta bemért tömege (mg)

#### 4.3.4 Antioxidáns kapacitás mérése

Az antioxidáns kapacitás mérést fotokemilumineszcens (PCL) módszerrel határoztuk meg. A célunk az volt, hogy megállapítsuk az antocianinokban dús meggykivonatok antioxidáns kapacitását. Vizsgáltuk ezen komponensek víz- és zsírolldható antioxidáns kapacitását. A méréseket a Photochem (Analytik Jena, Németország) készülékkel végeztünk, amely lehetővé teszi a vízzoldható antioxidáns kapacitás (ACW), valamint a

zsírolható antioxidáns kapacitás (ACL) meghatározását. A módszer fotokemilumineszcencián alapul. UV fény hatására a vizsgálati elegyhez külsőleg hozzáadott fotokémiai érzékenyítő komponensből szuperoxid gyök keletkezik, amelyet a minta antioxidáns tulajdonságú vegyületei eliminálnak. A maradék szuperoxid gyökök reagálnak a mintához adott specifikus detektor vegyülettel. A műszer a fotokémiai reakció során kibocsátott ún. kemilumineszcenciát méri, közvetett módon meghatározza a minta antioxidáns kapacitását (Popov és Lewin, 1996). A készülék a kalibrációs oldatsorozat segítségével számítja ki a minta vízzoldható antioxidáns kapacitását (ACW) aszkorbinsav ekvivalens egységben, valamint a zsírolható antioxidáns kapacitását (ACL) trolox ekvivalens egységben. A mérést a cég által forgalmazott ACW és ACL Kit (Jena AG Company, Németország) készlettel végeztük a gyártó javaslatai szerint, amely a következőket tartalmazza: ACW esetében: R1 reagens hígító (minta oldószer); R2 reagens ez a reakció puffer; R3 reagens, fényérzékenyítő detektáló reagens; R4 reagens, standard aszkorbinsav vízzoldékony antioxidáns kapacitás, méréséhez. ACL esetében: R1 reagens metanol (minta oldószer); R2 reagens ez a reakció puffer; R3 reagens, fényérzékenyítő detektáló reagens; R4 reagens, standard trolox zsírolékony antioxidáns kapacitás méréséhez. Az ACW esetén a mérést a következő módon hajtottuk végre: 1,5 ml R1 reagenshez hozzáadtunk 1 ml R2 reagenst, 25 µl R3 reagenst és 10 µl mintát. A reakcióelegyet Vortex keverővel kevertük, majd ezt követően mértük a Photochem készülékkel. A minták mérése során három párhuzamos mérést végeztünk. A minták vízzoldékony antioxidáns kapacitást µg aszkorbinsav ekvivalens/mg értékben száraz tömegre vonatkoztatva adtuk meg. Az ACL esetén a mérést a következő módon hajtottuk végre: 2290 µl R1 reagenshez hozzáadtunk 200 µl R2 reagenst, 25 µl R3 reagenst és 10 µl mintát. A reakcióelegyet Vortex keverővel kevertük, majd ezt követően mértük a Photochem készülékkel. A minták mérése során három párhuzamos mérést végeztünk. Az minták zsírolékony antioxidáns kapacitását µg trolox ekvivalens/mg értékben száraz tömegre vonatkoztatva adtuk meg.

#### **4.3.5 MALDI-TOF MS**

A 'Bosnyák' fajtakörhöz tarozó 'VN1' meggyfajta kivonat és HPLC frakciók egyes komponenseinek vizsgálatához tömegspektrumokat vettünk fel MALDI-TOF tömegspektrométerrel (Bruker Biflex III) pozitív ion módban. Mátrixként 2,5-dihidroxibenzoésavat (DHB) vagy 2,3,6-trihidrox-acetofenont (THAP) alkalmaztunk. A

készüléket antocianinok és melatonin  $[M+Na]^+$  ionjainak  $m/z$  értékeire (449,26 g/mol; 232,29 g/mol) kalibráltuk külső kalibrációt alkalmazva.

#### 4.3.6 Kinetikai mérések

A kinetikai méréshez 50 mM pH = 6,0 MES puffert használtunk, mely 5 mM kalcium acetátot, 51,5 mM NaCl-ot, valamint 152 mM  $NaN_3$ -ot tartalmazott (Paolucci és mts., 2002). A pH beállításához NaOH-ot és HCl-ot használtunk. Az előkészített puffert felhasználásig hűtve tároltuk.

Méréseinkhez rövid szubsztrátot alkalmaztunk, kromogén 2-klór-4-nitrofenil-4-O- $\beta$ -D-galaktopiranozil-maltozidot ( $GalG_2CNP$ , SORACHIM SA, Lausanne, Svájc). Modell-enzimként az emberi nyálból (IXA típusú SIGMA) származó  $\alpha$ -amilázt (EC 3.2.1.1.) használtuk. A kinetikai méréseket Jasco V550 típusú kétsugaras spektrofotométerrel végeztük, mely termosztálható. Reakcióelegy végtérfogata 500  $\mu$ l volt, melyből 200  $\mu$ l 0,5-6 mM 2-klór-4-nitrofenil-4-O- $\alpha$ -D-galaktopiranozil-maltozid ( $GalG_2CNP$ , SORACHIM SA, Lausanne, Svájc) szubsztrátot, 50 mM pH= 6,0 MES puffert és a megfelelő koncentrációjú inhibítort tartalmazta, melyet 37°C-on 5 percig inkubáltuk. A reakciót 5  $\mu$ l 2 nM-os HSA (EC 3.2.1.1.) enzim hozzáadásával indítottuk és mértük a kezdeti reakciósebességet. Az abszorbancia változást (melyet a felszabaduló kromofor csoport váltott ki) 120 másodpercig,  $\lambda = 400$  nm-en, puffer vakkal szemben mértük. Jasco Spectra Manager szoftver Time course measurement funkcióját alkalmaztuk a kapott görbe kezdeti szakasz meredekségének meghatározásához. Mindegyik minta mérését három-négy alkalommal megismételtük.

### 4.4 KLINIKAI VIZSGÁLATOK ELŐKÉSZÍTÉSE

#### 4.4.1 Nyálminták gyűjtéséhez szükséges engedélyek

A meggykivonatot tartalmazó rágógumi prevenció hatását, három korcsoportban vizsgáltuk. A 12 évesek száma 22, 18 és 20 év közöttiek száma 25 (fogorvostan hallgatók), míg a 30 év felettiak száma 23 volt. A klinikai vizsgálatban összesen 70 fő vett részt, ebből 45 nő és 25 férfi volt.

A DE FOK Gyermekfogászati és Prevenció nem önálló Tanszék és a Konzerváló Fogászati nem önálló Tanszék gyűjtötte az általunk vizsgált nyálmintákat, 4260-2014 és 4383-2015, DE KK RKEB/IKEB etikai engedélynek megfelelően.

Etikai engedély:



**DEBRECENI EGYETEM. KLINIKAI KÖZPONT**  
**FŐIGAZGATÓ: DR. ÉDES ISTVÁN EGYETEMI TANÁR**

**REGIONÁLIS ÉS INTÉZMÉNYI KUTATÁSETIKAI  
BIZOTTSÁG**



**ELNÖK: DR. SZÁNTÓ SÁNDOR EGYETEMI DOCENS**  
DE KK BELGYÓGYÁSZATI INTÉZET, REUMATOLÓGIAI TANSZÉK  
4032. DEBRECEN. NAGYERDEI KRT. 98  
TEL./FAX: +36-52-255091 E-MAIL: [SZANTO.SANDOR@MED.UNIDEB.HU](mailto:SZANTO.SANDOR@MED.UNIDEB.HU)

**TITKÁR: DR. SZENTMIKLÓSI JÓZSEF EGYETEMI DOCENS**  
DE ÁOK FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET  
4012. DEBRECEN. PF. 12.  
TEL.: +36 30 4409822 E-MAIL: [AJSZM948@GMAIL.COM](mailto:AJSZM948@GMAIL.COM)

*Érvényes: 2014 július 01-től*

**Kérelem saját kezdeményezésű ill. megbízásos jellegű, de nem gyógyszerrel  
(műszer, orvostechnikai eszköz, stb.) emberen végzett orvostudományi kutatás  
végzésére**

|                                                                                                                                                  |                                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 1.                                                                                                                                               | A vizsgálat címe (magyarul és angolul):                           |
| <b>A meggy anthocyaninjainak hatása a human nyál amiláz gátlására</b><br>Effect of sour cherry anthocyanins on human salivary amylase inhibition |                                                                   |
| 2.                                                                                                                                               | A vizsgálatvezető neve:                                           |
| Dr. Kelentey Barna Árpád                                                                                                                         |                                                                   |
| Beosztása, tudományos fokozata:                                                                                                                  |                                                                   |
| egyetemi docens, orvostudományok kandidátusa, PhD                                                                                                |                                                                   |
| A szervezeti egység neve, címe:                                                                                                                  |                                                                   |
| Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Kar, Konzerváló Fogászati Tanszék                                                                            |                                                                   |
| A vizsgálatvezető munkahelyi telefonszáma:                                                                                                       |                                                                   |
| 52/411-717/ 55814 v. 56834                                                                                                                       |                                                                   |
| Mobil telefonszáma:                                                                                                                              |                                                                   |
| 20/388-3372                                                                                                                                      |                                                                   |
| FAX száma:                                                                                                                                       |                                                                   |
| -                                                                                                                                                |                                                                   |
| E-mail címe:                                                                                                                                     |                                                                   |
| <a href="mailto:kelentey.barna@dental.unideb.hu">kelentey.barna@dental.unideb.hu</a>                                                             |                                                                   |
| 3.                                                                                                                                               | Milyen anyagi forrásból történik az adott kutatás finanszírozása: |

pl. pályázat (OTKA, NKFP, TÁMOP, stb) vagy ha nem kapcsolódik pályázathoz, akkor mi a kutatás anyagi fedezete ?

**AGR\_Piac\_13-1-2013-0039 számú, „Növényi extraktumok (gyümölcsök) hatóanyagainak egyszeri dózist tartalmazó, per os bevételre szánt preventív gyógyhatású készítmény”** elnevezésű, hazai finanszírozású kutatási pályázat

4. A szponzor neve, címe, elérhetősége és a kapcsolattartó személy (CRA) neve, mobil telefonszáma:

JÁNER-HÚS Feldolgozó és Kereskedelmi Zártkörűen Működő Részvénytársaság  
1036 Budapest, Pacsirtamező u. 22.

Kapcsolattartó: Dr. Molnár Szandra

Tel.szám: 06 20 428 0312

5. A vizsgálatban résztvevő kutatók (beosztás, tudományos fokozat, munkahely):  
*A résztvevő kutatók közül jelöljön meg egy személyt (telefonszámmal és e-mail elérhetőséggel), aki a vizsgálatvezető megbízása alapján a study-val kapcsolatban szükség esetén felvilágosítást tud adni.*

Dr. Kelentey Barna Árpád egyetemi docens PhD  
DE Fogorvostudományi Kar, Konzerváló Fogászati Tanszék  
Tel.: 20/388-3372  
E-mail: [kelentey.barna@dental.unideb.hu](mailto:kelentey.barna@dental.unideb.hu)

Dr. Nemes Judit egyetemi adjunktus PhD DE FOK, Gyermekegészségügyi és Fogszabályozási Tanszék  
Dr. Remenyik Judit egyetemi adjunktus PhD DE Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi-, és Környezetgazdálkodási Kar  
Dr. Gyémánt Gyöngyi egyetemi docens PhD DE TTK Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék  
Dr. Vecsernyés Miklós egyetemi docens PhD DE GYTK Gyógyszertechnológiai Tanszék  
Dr. Váradi Judit egyetemi adjunktus PhD DE GYTK Gyógyszertechnológiai Tanszék  
Dr. Fenyvesi Ferenc egyetemi adjunktus PhD DE GYTK Gyógyszertechnológiai Tanszék  
Szászné Dr. Réti-Nagy Katalin tudományos segédmunkatárs DE GYTK Gyógyszertechnológiai Tanszék

6. A vizsgálat leírása és indoklása (részletes protokoll). Terjedelmesebb pályázati protokoll esetében itt csak tömör összefoglalás szükséges, a teljes anyagot külön mellékletben kérjük!

lásd mellékelt vizsgálati protokoll

7. A vizsgálatba bevont személyek száma (az adott vizsgálóhelyen), életkoruk:

összesen 72 fő férfiak és nők kb. egyenlő arányban 3 életkori csoportban:

1. csoport (12 évesek): 12 eset és 12 kontroll
2. csoport (18-20 évesek): 12 eset és 12 kontroll
3. csoport (30 év felettiek): 12 eset és 12 kontroll

|                                     |
|-------------------------------------|
| A vizsgálatok tervezett kezdete:    |
| 2014. október                       |
| A vizsgálatok tervezett befejezése: |
| 2014. december                      |

**8. Személyi, szakmai és tárgyi feltételek megléte:**

A klinikai vizsgálat helyszíne: DE Fogorvostudományi Kar szakrendelői  
A szűrővizsgálatot gyakorlott, szakvizsgával rendelkező fogorvos végzi  
Tárgyi feltételek: fogászati szék, fogászati tükör, szonda, centrifuga csövek, hűtőszekrény

A meggykivonatokat a DE GYTK Gyógyszertechnológiai Tanszék munkatársai formulálják rágógumi alapon.  
A nyálminták  $\alpha$ -amiláz aktivitásának vizsgálata a DE Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi-, és Környezetgazdálkodási Kar analitikai laboratóriumában történik

Eredmények kiértékelését statisztikus bevonásával végezzük

**9. Melyek az alkalmazott beavatkozások lehetséges kockázata? Rendelkezésre állnak-e a vizsgálóhelyen a nem kívánt hatások kivédésére a megfelelő személyi és dologi feltételek?**

Csak fogorvosi szűrővizsgálat történik, invazív beavatkozás nem, kockázattal, káros mellékhatással nem számolunk.  
A kísérleti rágógumik fogyasztása kockázattal nem jár, ugyanis a rágógumi alapanyagaira illetve a meggyre allergias betegetek eleve kizárjuk a vizsgálatból

**10. A tervezett beavatkozással kapcsolatos hazai és nemzetközi tudományos előzmények rövid összefoglalása:**

Mivel a fogszuvasodás mindmáig világszerte népbetegségnek tekinthető, folyamatos a megelőzést célzó kutatás, fejlesztés. A szuvasodás etiológiáját tekintve multifaktoriális, fontos szerepet

játszanak benne a táplálkozás és a szájüregi tényezők, ezen belül is a rezidens baktérium flóra és a nyál. Humán eredetű nyál fontos alkotóeleme az  $\alpha$ -amiláz (HSA), amely egy multifunkcionális enzim. Szerepet játszik a keményítő kezdeti emésztésében, valamint hidrolitikus aktivitása mellett baktériumkötő hatással is rendelkezik. A HSA miután a baktériumhoz kötődött, még rendelkezik körülbelül 50%-os enzim aktivitással. Az enzim képes keményítőt bontani, így a baktérium számára ez egy „élelmiszerforrás”. Ez a folyamat a dentális plakk kialakulásához, valamint a baktériumok által termelt savtermelés miatt fogszuvasodáshoz is vezethet [1]. Egyetemünkön évek óta folynak humán nyál eredetű  $\alpha$ -amiláz enzimmel és gátlószereivel kapcsolatos vizsgálatok. Eredményeket értünk el az enzim szerkezetének felderítésében és különböző természetes és szintetikus anyagok enzimgátló hatásának vizsgálatával [2-12]. Az elmúlt két évtizedben egyre több vizsgálat fordult a növényi polifenolok irányába, melyek számos kedvező élettani hatásuk mellett fogszuvasodás ellenes hatással is rendelkeznek. Számos, a mindennapi diétában szereplő, könnyen elérhető növény (tea, áfonya, málna, szőlő, stb.) esetében igazolták a kedvező szájüregi hatást [13] Ez többért: (1) a S. mutans direkt gátlása, (2) a baktériumok fogfelszínre tapadásának gátlása illetve (3) a glükózil-transzferáz illetve az amiláz emzim gátlása. Legújabb vizsgálataink a meggyben található antocianinok amiláz gátló hatását igazolták [14]. A meggykivonat kiválóan formulálható rágógumi formájában, amely előnyös adagolást tesz lehetővé minden korcsoport számára. Erre alapozva tervezzük az itt ismertetett klinikai vizsgálatokat.

1. Ramasubbu N, Paloth V, Luo Y, Brayer GD, Levine MJ. Structure of human salivary  $\alpha$ -amylase at 1.6 Å resolution: Implications for its role in the oral cavity. *Acta Cryst.*(1996). D52, 435-446
2. **Gyémánt G**, Hovánszki G, Kandra L. Subsite mapping of the binding region of  $\alpha$ -amylases with a computer program. *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 5157-5162.
3. Kandra L, **Gyémánt G**, **Remenyik J**, Ragunath C, Ramasubbu N. Subsite mapping of human salivary alpha-amylase and the mutant Y151M. *FEBS Lett.* 544 (2003) 194-198.
4. **Gyémánt G**, Kandra L, Nagy V, Somsák L. Inhibition of Human Salivary  $\alpha$ -Amylase by Glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312/2 (2003) 334-339.
5. **Remenyik J**, Ragunath C, Ramasubbu N, **Gyémánt G**, Lipták A, Kandra L. Introducing transglycosylation activity to human salivary alpha -amylase (HSA) *Org. Lett.* 5 (2003) 4895-4898.
6. Ramasubbu N, Ragunath C, Mishra PJ, Thomas LM, **Gyémánt G**, Kandra L. Human salivary alpha -amylase Trp58 situated at subsite -2 is critical for enzyme activity *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 2517-2529.
7. Kandra L, **Gyémánt G**, Zajác Á, Batta G. Inhibitory effects of tannin on human salivary alpha-amylase *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319/4 (2004) 1265-1271
8. Kandra, L, **Remenyik, J**, **Gyémánt G**, Zajác Á, Batta G. Synthesis of a novel inhibitor specific for human alpha -amylases In: *Rare sugars, creating a novel bio-word with rare sugars*. Eds.: Shigeyuki Tajima and Yasuhiko Asada 2004, 289-293.
9. Kandra L, **Remenyik J**, Batta G, Somsák L, **Gyémánt G**, Park KH. Enzymatic synthesis of a new inhibitor of alpha-amylases: acarviosinyl-isomaltosyl-spirothiohydantoin. *Carbohydr. Res.* 340 (2005) 1311-1317.
10. Ramasubbu N, Ragunath C, Sundar K, Mishra PJ, **Gyémánt G**, Kandra L. Structure-function relationships in human salivary alpha-amylase: role of aromatic residues. *Biologia, Bratislava*, 60 (2005) 47-56
11. Kandra L, Zajác Á, **Remenyik J**, **Gyémánt G**. Kinetic investigation of a new inhibitor for human salivary alpha-amylase *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334 (2005) 824-828.
12. Zajác Á, **Gyémánt G**, Kandra L. Aleppo tannin: structural analysis and salivary amylase inhibition *Carbohydr. Res.* 342 (2007) 717-723.
13. Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarelli A, Pinto G, Pollio A. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules* 16 (2011) 1486-1507.
14. Homoki JR, Nemes A, Fazekas E, **Gyémánt G**, Balogh P, Gál FG, Al-Asri J, Mortier J, Wolber G, Babinszky L, **Remenyik J**. Anthocyanin composition, antioxidant efficiency, and  $\alpha$ -amylase inhibitor activity of different Hungarian varieties of sour cherry (*Prunus cerasus L.*) *Phytochemistry* 2014 közlésre benyújtva

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11. | Az 1/2009 EüM sz. rendelet értelmében megbízásos jellegű vizsgálat esetén a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal Népegészségügyi Szakigazgatási Szerve részére a pályázat beadását megelőzően szükséges 114.000- Ft átutalása a következő számlaszámra:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|     | 10034002-00301954-00000000                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|     | Ennek igazolását is kérjük mellékelni (beszkennelt formában)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 12. | A vizsgálatkal kapcsolatos dokumentumok felsorolása: (kérjük, jelölje X-szel a csatolt dokumentumokat!)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|     | <p>X A vizsgálat protokollja</p> <p>A vizsgálat magyar nyelvű szinopszisa</p> <p>Investigator's Brochure (A vizsgálandó műszerrel, technikával, stb. kapcsolatos mindennemű, korábbi információ)</p> <p>X A vizsgálatvezető és a résztvevő kutatók tudományos életrajza</p> <p>X Az intézetvezető/intézetvezetők támogató levele</p> <p>A betegek/önkéntesek toborzásához használt anyagok, hirdetések</p> <p>X Magyar nyelvű betegtájékoztató</p> <p>X Magyar nyelvű beleegyező nyilatkozat</p> <p>Az Eütv. 164. § szerinti felelősségbiztosítás másolata (nem szponzorált vizsgálat esetén a Debreceni Egyetem felelősségbiztosítása érvényes, míg szponzorált vizsgálatoknál a biztosítást a szponzornak kell megkötnie) <b>A szerződés kötés folyamatban</b></p> <p>Központi engedélyező/véleményező szervezetnek a tervezett vizsgálatokkal kapcsolatos döntése</p> <p>A vizsgálatban résztvevő személyeknek (egészséges önkénteseknek és betegeknek) adott valamennyi juttatás és kompenzáció</p> <p>X HBM Kormányhivatalnak küldendő adatlap kitöltött formában</p> <p>X A HBM Kormányhivatalnak megküldött regisztrációs díj befizetéséről szóló igazolás</p> <p>X laboratóriumi analitikai mérési jegyzőkönyv</p> <p>X. mikrobiológiai vizsgálat eredménye</p> <p>Egyéb dokumentumok:</p> <p>X Élelmiszergyártás változás bejelentő</p> <p>X Gyártmánylap</p> |

*Tudomásul veszem, hogy a fenti adatok megadása és a vizsgálatok során az egészségügyről szóló 1997. évi CLIV. Törvény, a 23/2002. (V.9.) EüM rendelet, a 235/2009 sz. Kormányrendelet és a hatályos - a vizsgálat elvégzésével kapcsolatos egyéb – hatályos rendeletek szellemében járok el.*

Dátum: Debrecen, 2014. 10. 20.

  
 vizgálatvezető


  
 intézetvezető\*

#### FONTOS!

- A saját kezdeményezésű kutatás dokumentációja az RKEB/IKEB elnökének és titkárának küldendő meg kizárólag elektronikus formában a [szanto.sandor@med.unideb.hu](mailto:szanto.sandor@med.unideb.hu) és [ajszm948@gmail.com](mailto:ajszm948@gmail.com) e-mail címekre.

A kérelmi űrlapot minden esetben aláírva és lepecsételve szíveskedjenek megküldeni a fenti e-mail címre (beszkennelt formában pdf formátumban; ne haladja meg az 1 MB-ot!) az összes többi dokumentummal együtt (a kitöltött – HBM Kormányhivatalnak küldendő - kitöltött adatlap minden esetben doc vagy docx formátumban maradjon!).

- \* Amennyiben az intézetvezető és a vizgálatvezető azonos személy, az intézetvezető helyett a kérelmi űrlapot az intézetvezető helyettese írja alá!
- **Megjegyzés:** orvostechnikai eszközzel végzendő beavatkozások esetében célszerű áttanulmányozni az Egészségügyi Engedélyezési és Közigazgatási Hivatal honlapját (<http://www.eekh.hu>) is!

Befogadó nyilatkozat:

---



**DEBRECENI EGYETEM**  
**FOGORVOSTUDOMÁNYI KAR**



Debreceni Egyetem Klinikai Központ  
Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottság  
Dr. Szántó Sándor  
egyetemi docens részére  
Debreceni Egyetem Klinikai Központ  
Belgyógyászati Intézet, Reumatológiai Tanszék

Iktatószám: OFOK/218/2014.  
Tételszám: 49.05

Tárgy: hozzájárulás

Helyben

Befogadó nyilatkozat

Hozzájárulok és engedélyezem, hogy a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Karának két dolgozója, Dr. Kelentey Barna és Dr. Nemes Judit a Karon betegektől kevert nyálgyűjtést végezzen a leírt protokoll szerint.

A kutatás címe: A meggy antocianinjainak hatása a humán nyál-amiláz gátlására.

A vizsgálat vezetője: Dr. Kelentey Barna egyetemi docens.

Debrecen, 2014. október 17.

  
Dr. Hegedűs Csaba  
egyetemi tanár  
a Fogorvostudományi Kar dékánja



#### **4.4.2 Klinikai vizsgálatban résztvevők meghatározása**

Ha a fogszuvasodás előfordulását szeretnénk vizsgálni, akkor kvantitatív mérőszámokra van szükségünk. Ezt fejezi ki a caries index. A fogszuvasodás bizonyos idő után üregképződéssel járó folyamat, mely maradandó nyomot hagy a fogazaton és ezen elváltozás a fogszuvasodás lefolyását tekintve irreverzibilis. Ha ez az állapot tartós, akkor regisztrálható kezeletlen fogszuvasodási lézió alakul ki tömések, koronázott és elvesztett fogak formájában. A fogszuvasodásban szenvedő fogak számszerűsítése DMF-mérőszámmal határozható meg, ahol a D (decayed)-szuvas, F (filled)-tömött és M (missing)-hiányzó fogakat (DMF-T) vagy felszíneket (DMF-S) jelenti.

Valamennyi önkéntesnél megtörtént a részletes anamnézis felvétel. Információt kaptunk a vizsgálatban résztvevők caries indexéről, mely a maradandó- és a tejfogakra vonatkozó romlott, hiányzó és tömött fogak számát jelenti (DMF-T, dmf-t), továbbá meghatározták a bomló fogfelületek számát is (DS). A fogszuvasodáson kívül, más látható orális infekció, illetve szisztémás betegség nem volt jellemző az önkéntesekre.

A vizsgálatban résztvevőknek a következő kritériumoknak kellett megfelelni. Írásos beleegyezés (betegtájékoztató és a beleegyező nyilatkozat), valamint a megfelelő életkor. A kizárás kritériumai között szerepelt a dohányzás és a rendszeres gyógyszerszedés, allergiás reakció a meggyre és/vagy a rágógumi összetevőire. Ezenkívül, valamennyi résztvevő kitöltött egy kérdőívet, mely a páciens általános egészségügyi állapotáról, étkezési, valamint a fogápolási szokásairól gyűjtött információt.

#### **Betegtájékoztató**

Kérjük, figyelmesen olvassa el a tájékoztatót!

Köszönjük, hogy részvételével segíti kutatómunkánkat, melynek célja, egy természetes gyümölcs (meggy) kivonat fogszuvasodás megelőző hatásának vizsgálata. A kivonat a gyümölcs húsból készülő, enyhén savanykás, meggyízú anyag, melyet rágógumi/rágótabletta formájában tudunk bejuttatni a szájüregbe. A rágógumi elrágcsálását követően a nyálban szeretnénk mérni a hatóanyag koncentrációt.

A vizsgálat menete

1. egy rövid kérdőívvel felmérjük az Ön (gyermek) táplálkozási és szájaápolási szokásait, valamint általános egészségi állapotát (krónikus betegségek, allergiák, gyógyszerszedések)
2. alapos szájbörlítés (vízzel)
3. fogorvosi szűrővizsgálat következik, mely fájdalommentesen tükör és szonda segítségével történik és tájékozódunk a fogak és az íny állapotáról. Az adatokat kartonon rögzítjük.

4. un. nyugalmi nyál vétele. Az Ön feladata 1-1,5 ml nyál „beleköpködése” a kapott csövecskébe (egyszer használatos centrifuga cső)
5. egy darab kísérleti rágógumi rágása 1 percig, majd a rágó kiköpését követően un. stimulált nyál vétele, a korábbi módszerrel (1 ml). Az, hogy Ön (gyermeke) hatóanyagot tartalmazó vagy semleges (placebo) rágógumit kap az a véletlen műve, ízük egyforma.
6. A stimulált nyál vételét megismételjük, immár előzetes rágógumizás nélkül, 10, 20 és 30 perc múlva (1-1 ml).

A vizsgálatban való részvétel teljesen önkéntes, érte juttatás nem jár. A teszt kitöltése, a fogászati szűrővizsgálat és a nyálminták vétele összesen kb. 45-60 percet igényel.

A kísérleti rágógumik fogyasztása kockázattal nem jár, mellékhatással nem kell számolni. Természetesen, ha Ön (gyermeke) allergiás a rágógumik bármely alapanyagára vagy a meggyre nem vehet részt a vizsgálatban.

Segítőkész együttműködését még egyszer köszönjük!

### **Beleegyező nyilatkozat**

Alulírott, ..... kijelentem, hogy a vizsgálatra vonatkozó teljes körű tájékoztatást megkaptam, a részvételt önként vállalom. A feltételeket megértettem és elfogadom. Aláírásommal beleegyezem adataim (név nélkül) és eredményeim felhasználásába.

.....

aláírás

Debrecen, 2014. ....

## Kérdőív

Név:.....

Születési év: .....

1. Milyen gyakran jár fogászati szűrővizsgálatra?

- a. félévente (1)
- b. évente (2)
- c. probléma esetén (3)
- d. sohasem voltam eddig (4)

|          |             |
|----------|-------------|
| 1: eset  | 2: kontroll |
| 1: férfi | 2: nő       |

2. Milyen gyakran mos fogat?

- a. naponta egyszer (1)
- b. reggel és este (2)
- c. minden étkezés után (3)
- d. ha eszembe jut (4)

3. Használ-e fogselymet?

- a. nem (0)
- b. igen (1)

4. Használ-e szájvizet?

- a. nem (0)
- b. igen (1) Milyet?

.....

5. Szokott-e vérezni az ínyme?

- a. nem (0)
- b. igen (1)

6. Követ-e valamilyen speciális étrendet?

- a. nem (0)
- b. igen (1) Milyet?

.....

7. Édességet milyen gyakran fogyaszt? (több is jelölhető)

- a. minden főétkezéshez (1)
- b. naponta egyszer főétkezéshez (2)
- c. főétkezések között (tízórára, uzsonnára) (3)
- d. egész nap rágcsálok (4)
- e. ritkán, nem vagyok édesszájú (5)

8. Gyümölcsöt milyen gyakran fogyaszt? (több is jelölhető)

- a. minden főétkezéshez (1)
- b. naponta egyszer főétkezéshez (2)
- c. főétkezések között (tízórára, uzsonnára) (3)
- d. naponta többször is, rendszertelenül (4)
- e. ritkán, nem szeretem (5)

9. Mit iszik a főétkezésekhez? (több is jelölhető)

- a. víz (1)
- b. tej (2)
- c. gyümölcslé (3)
- d. szénsavas üdítő (4)
- e. egyéb (5)      Mi az?

.....

10. Mit iszik napközben, ha szomjas?

- a. víz (1)
- b. tej (2)
- c. gyümölcslé (3)
- d. szénsavas üdítő (4)
- e. egyéb (5)      Mi az?

.....

11. Szokott-e rágógumizni?

- a. nem, soha (0)
- b. igen, de ritkán (1)
- c. igen, naponta (2)
- d. igen, naponta többször is (3)

12. Allergiás-e valamire (étel (meggy), pollen, gyógyszer stb.)?

- a. nem (0)
- b. igen (1)      Mire?

.....

.

13. Stresszes az élete?

- a. nem (0)
- b. igen (1)

14. Szokott-e száradni a szája?

- a. nem (0)
- b. igen (1)      Mikor?

.....

15. Van-e valamilyen krónikus betegsége?

- a. nem (0)
- b. igen (1)      Mi az?

.....

16. Szed-e gyógyszert rendszeresen?

- a. nem (0)
- b. igen (1)      Mit?

.....

17. Jelenleg szed-e valamilyen gyógyszert?

- a. nem (0)
- b. igen (1)      Mit?

.....

#### **4.4.3 Nyálminta gyűjtés menete**

A nem stimulált (nyugalmi) nyálat 14 és 16 óra között gyűjtöttük valamennyi páciensnél a napi ingadozás elkerülése érdekében. A nyálgyűjtés előtt a résztvevőket arra kértük, hogy öblítsék ki a szájüregüket vízzel, majd kényelmesen leültettük őket néhány percre. 5 perc elteltével a vizsgálatban résztvevőket arra utasítottuk, hogy nyeljék le a nyálat a szájukból, majd hagyják, hogy a nyál újra összegyűljön a szájüregben, és egy steril kémcsőbe köpjének. Majd a meggykivonattal készített vagy azt nem tartalmazó, szabványos méretű cukormentes rágógumi 1 perces rágása után az önkénteseket arra kértük, hogy nyeljék le a keletkezett nyálat, eltávolítottuk a rágógumit a szájüregből és azonnal összegyűjtöttük a keletkező inger nyálat valamennyi korcsoportnál, kontroll- és esetcsoportoknál egyaránt. Ezt követően 10, 20, 30 perc elteltével szintén megkértük az önkénteseket a nyálminták steril kémcsőbe történő ürítésére. Az ily módon összegyűjtött mintákat laboratóriumba, -20°C-on tároltuk az elemzésig.

## **4.5 AZ KLINIKAI VIZSGÁLAT SORÁN ALKALMAZOTT MÓDSZEREK**

### **4.5.1 Meggy extraktum készítése**

A vizsgálatainkhoz és a rágógumi készítéséhez a 'Csengődi csokros' meggyfajtából szelektált 'VN1' fajtát használtuk. A gyümölcs mintákat laboratóriumba szállítottuk, mostuk, magoztuk és homogenizáltuk egy Braun Multiquick botmixerrel. A teljesen homogenizált mintákat kétszeres térfogatú savanyított etanollal (0,1% HCl) extraháltuk mágneses keverővel 1 órán át. Ezután a mintákat szűrtük, és az oldószert 40°C-on vákuumban rotációs bepárlón (Heidolph, Németország) bepároltuk. Előzetesen mikrobiológiai vizsgálatot végeztünk, mely igazolta, hogy a fejlesztett kivonat humán kutatási célra felhasználható. A mikrobiológiai vizsgálat eredménye a 1. mellékletben kerül bemutatásra.

### **4.5.2 Rágógumi készítés meggy extraktummal és anélkül**

A rágógumit olvasztásos eljárással állította elő a DE GYTK Gyógyszertechnológiai Tanszékről Dr. Váradi Judit és munkacsoportja. A készítményhez Geminis T BHA gumialapot (CAFOSA), xilitet, citromsavat, glicerint, szacharint (Sigma), borsmenta illóolajat és Kirsch aromát (Akras) használtak. A xilitet feloldották tisztított vízben 80°C-on, majd hozzáadták a gumialapot és vízfürdőben megolvasztották. Az íz-maszkírozó szereket, az ízesítőszerkeket (citromsav, glicerin, szacharin) és 0,1 g 'VN1' fajta meggykivonatot, melynek antocianin koncentrációja 11,87 mg/100mg tisztított vízben feloldották. A kontroll rágógumi termékek esetében a meggykivonatot nem adták a vizes fázisba. A vizes fázist emulgeálták az olvasztott gumi alapfázisban 60°C-on. Végül a borsmenta illóolajat 40°C-on adták hozzá. Az egyenletes keveréket 2,5 g-os darabokra osztották fel és gömb alakú termékeket készítettek. Szobahőmérsékleten végzett 12 órás kondicionálási idő után a rágógumi-golyókat 8-15°C-on tároltuk egy műanyag edényben, amíg alkalmazásra nem kerültek.

### **4.5.3 Rágógumi vizsgálata**

A vizsgálat során meghatározták a rágógumiból kioldódó meggykivonat százalékos arányát az idő függvényében. A vizsgálat elvégzéséhez dörzsmozsarat használtak, mert rágókamrás kioldódásvizsgálóval nem rendelkeztek. A rágást a dörzsmozsárhoz tartozó dörzsölővel (pisztillus) modellezték, melyet 1 nyomóhatás/másodperc frekvenciával

mindig ugyanaz az ember végezte. A kioldóközeg, mely a nyálat szimbolizálta pH=6,00 volt, a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv ajánlása szerint. A vizsgálat során 20,0 ml kioldóközeget adagoltak a mintához. Az 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 15 percben 0,5 ml mintát vettek, melyet valamennyi mintavétel után visszapótoltak. A kémcsöveket feliratozták és spektrofotométerrel mérték a minták abszorbanciáját  $\lambda = 530$  nm-en. A bemutatott vizsgálatot meggykivonat mentes rágógumival is elvégezték és ezen eredményeket kontrollként használták. Az egyes időpontokhoz tartozó meggykivonatot tartalmazó rágógumi abszorbanciája és a kontroll, azaz meggykivonatot nem tartalmazó rágógumi abszorbanciájának a különbsége megadja a meggykivonatra vonatkozó abszorbanciát. Ezen eredményekből megállapították a rágógumiból kioldódott meggykivonat százalékos kioldódását az idő függvényében.

Ezen vizsgálattal igazolták, hogy a rágógumi antocianin tartalma 45%-ban oldódik ki 15 perces vizsgálati idő alatt. Az időegység alatt kioldódó antocianinok koncentrációja az első 2-3 percben volt a legintenzívebb, mely ideális a caries prevenciója szempontjából.

#### **4.5.4 A nyálminták $\alpha$ -amilázaktivitásának mérése**

A kinetikai méréshez 50 mM pH = 6,0 MES puffert használtunk mely, 5 mM kalcium acetátot, 51,5 mM NaCl-ot, valamint 152 mM  $\text{NaN}_3$ -ot tartalmazott (Paolucci és mts., 2002). A pH beállításához NaOH-ot és HCl-ot használtunk. Az előkészített puffert felhasználásig hűtve tároltuk. Méréseinkhez rövid szubsztrátot alkalmaztunk, kromogén 2-klór-4-nitrofenil-4-O- $\alpha$ -D-galaktopiranozil-maltozidot (GalG<sub>2</sub>CNP, SORACHIM SA, Lausanne, Svájc). A kinetikai méréseket Jasco V550 típusú kétsugaras spektrofotométerrel végeztük, mely termosztálható. Reakció elegy végtérfogata 500  $\mu\text{l}$  volt melyből 200  $\mu\text{l}$  5 mM 2-klór-4-nitrofenil-4-O- $\alpha$ -D-galaktopiranozil-maltozid (GalG<sub>2</sub>CNP, SORACHIM SA, Lausanne, Svájc) szubsztrátot és 285  $\mu\text{l}$  MES puffert tartalmazott, melyet 37°C-on 5 percig inkubáltuk. A nyálmintákat (10  $\mu\text{l}$ ) 1:200 arányban hígítottuk. A reakciót 15  $\mu\text{l}$  hígított nyál hozzáadásával indítottuk és mértük a kezdeti reakciósebességet. Az abszorbancia-változást, melyet a felszabaduló kromofor csoport váltott ki, 120 másodpercig 400 nm puffer vakkal szemben mértük (Gyémánt és mts., 2003). Jasco Spectra Manager szoftver Time course measurement funkcióját alkalmaztuk a kapott görbe kezdeti szakasz meredekségének meghatározásához. Mindegyik kísérletet

három-négy alkalommal megismételtük. A nyál  $\alpha$ -amilázaktivitást (sAA) (1 egység =  $\mu\text{mol/perc}$ ) a kiindulási sebesség  $\Delta A/\text{min}$  értékével számoltuk.

#### 4.5.5 Mikrobiológiai mérések

Az élő  $\beta$ -hemolitikus *Streptococcus mutans* törzsek kimutatására és mennyiségének meghatározására a nyál-mintákat tenyésztettük 5%-os defibrinált juhvérrel (Biocenter) dúsított triptáz-szójaalapú agaron (Sigma Aldrich). Ezen a médiumon a  $\beta$ -hemolitikus *S. mutans* törzseknek jellegzetes morfológiájuk van (Wolff és Liljemark, 1978). A vörösvérsejtek teljes lizálódása áttetsző, sárga üreges körökben jelentkezik az egyedülálló *S. mutans* kolóniák körül, amelyek megkönnyítik e törzsek morfológiai azonosítását. Ahhoz, hogy egyedi bakteriális telepeket kapjunk,  $10^4$ -szeres hígítást hajtottunk végre egy II. osztályú lamináris áramlású szekrényben a környezeti szennyeződés elkerülése érdekében. Az agar lemezeket  $37^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk és 5-10%  $\text{CO}_2$ -ot tartalmazó aerob körülmények között 4 napig inkubáltuk. Ezután morfológiai azonosítást végeztünk, végül pedig a  $\beta$ -haemolizáló *S. mutans* törzsek számát megszámláltuk és  $10^4$ -gyel szoroztuk. A tiszta agar lemezek esetében a tenyésztést  $10^3$ ;  $10^2$ ;  $10^1$  hígítással megismételtük.

#### 4.5.6 Statisztikai analízis

A mérési eredményeink kiértékeléséhez az adatok átlagértékét és a szórást kiszámoltuk. Az adatokat statisztikailag elemeztük SPSS statisztikai szoftverrel, 17. változat (SPSS Inc, Chicago, IL). Az egyirányú varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztuk. A szignifikancia szintjét  $p < 0,05$  értékre állítottuk be.

Mérési eredményeink kiértékeléséhez leíró statisztikát alkalmaztunk, hogy összefoglaljuk a nyál amilázaktivitás és a *Streptococcus mutans* szám mérési eredményeit. Az átlagértékeket és a szórást a nem stimulált nyálból minden egyes időpontban kiszámoltuk. Az adatok normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov tesztel vizsgáltuk.

A két független minta t-próbát használtuk, hogy összehasonlítsuk a kategóriák és a nyál-amilázaktivitás szintek közötti különbséget, az egyes paraméterek esetében. Pearson korrelációs koefficiens  $(r)$  és lineáris regressziós módszert alkalmaztunk, hogy elemezzük a kapcsolatot az életkor és a száj állapota között (DMF-T) a nyugalmi nyál-amilázaktivitás szint és a DMF-T különböző korcsoportban.

A három korcsoportban az orális állapotot (DMF-T) a szokásos ANOVA helyett Welch ANOVA-val vizsgáltuk. Amikor az ANOVA szignifikáns volt, egy post-hoc tesztet alkalmaztunk többszörös összehasonlításra. Ha egyenlő varianciákat feltételeztünk, akkor a Bonferroni tesztet használtuk, ha a csoportok közötti variancia egyenlőtlen, akkor a Games-Howell tesztet alkalmaztuk. Az időhatások értékelését a kategóriák között (kontroll és kezelt) egyszempontú ANOVA-val, ismételt mérésekkel végeztük el, hogy összehasonlítsuk a nyál-amilázaktivitás átlagos különbségeit. A kéttényezős ANOVA-t ismételt mérésekkel végeztük el a kategóriák (kontroll és kezelt), a három korcsoport és az interakciós hatás közötti időhatások értékelésére a *Streptococcus mutans* szintek átlagos különbségeinek összehasonlítására.

A megállapított különbségeket a Bonferroni korrekció szerint határoztuk meg. Az 5%-os szignifikanciaszintű kétoldalú teszteket használtuk. Minden statisztikai számítást a 23.0-as statisztikai csomaggal (SPSS, Chicago, IL, USA) végeztünk.

## 5. SAJÁT VIZSGÁLATOK ÉS EREDMÉNYEK

Az általunk vizsgálni kívánt meggyfajták kiválasztásának két fő szempontja volt. Vizsgálatainkhoz olyan fajtákat kerestünk, melyek az irodalomból egyáltalán nem, vagy csak részben ismertek. A másik szempont, hogy ezen fajtáknak a hazai meggytermesztésben jelentős szerepük legyen. Az önmeddő 'Pándy' meggy legfontosabb pollenadója a 'Cigánymeggy' volt. Így a 'Pándy' és a 'Cigánymeggy' volt a főfajtakör a magyarországi meggytermesztésben évtizedeken át. A 'Cigánymeggy' valószínűleg, magyar eredetű fajtakör, Kárpát-medencében őshonos, a betegségekre kevésbé fogékony, téli fagyokkal szemben ellenállóbb, mint a többi. Dr. Brózik Sándor klónszelekciós munkájának eredménye, hogy három Pándy és három 'Cigánymeggy' klón ('Cigánymeggy 7', 'Cigánymeggy 59' és a 'Cigánymeggy 404') kapott fajtaelismerést (Hrotkó, 2003). Vizsgálatainkba szerettünk volna olyan meggyfajtát bevonni, mely ősi jellegeket őrizhet, továbbá, mivel évtizedekig a főfajtakör egyike volt, jelentősége óriási a hazai meggytermesztésben, így a 'Cigánymeggy' klónok közül a 'Cigánymeggy 59' fajtát választottuk.

A kutatásainkba olyan meggyfajtákat is tanulmányoztunk, melyek más-más „tájfajtakörök” ismert fajtái. Kiskörös, Akasztó, Csengőd vidékén alakultak ki a 'Bosnyák' meggyek, míg a nyírségi termőtájon a 'Kántorjánosi' fajtakör. Új fajtajelöltek kialakulásának egyik lehetséges módja volt, hogy a termelő a gyökérnemes fa kipusztulása esetén nem vásárolt másikat, hanem gyökérsarjat ültetett, ha ez véletlenül magonc volt, akkor új fajta keletkezett. Ezen eltérő egyedekhez tartoznak a 'VN1' és 'VN4' fajták melyek a 'Bosnyák' fajtakörből kiemelt egyedek. A 'Bosnyák' fajtakör legismertebb egyede a „Csengődi” fajta, melynek szelekciója Dr. Apostol János nevéhez fűződik. A fajtára jellemző, hogy különösen rezisztens a blumeriellás levélfoltosodással és a moniliás ágszáradással szemben. A fajta 1990-ben kapott állami minősítést (Hrotkó, 2003). Így a 'Bosnyák' tájfajtakörből a 'VN1' fajtát választottuk a kutatásainkhoz. A 'Kántorjánosi' fajtakörből a 'Debreceni bőtermőt', és a 'Kántorjánosit' vontuk be a vizsgálatainkba, mert nagy szerepük van a hazai meggytermesztésben, hisz érésük során ('Debreceni bőtermő' június végén, míg a 'Kántorjánosi' július elején fordul termőre) folyamatos friss meggyet biztosítanak a hazai piacon, valamint ezen két tájfajtának jelentős szerepe van a magyar meggyszaporításban. Bár az 'Újfehértói fürtös' meggyfajta szintén fontos szerepet játszik a hazai meggytermesztésben de ismert a nemzetközi

irodalomban, több kutatásban fordult elő, így az általunk kiválasztott fajták közé már nem került be, helyette egy változatát az ‘A’ -t vontuk be a kísérleteinkbe.

## 5.1 A MEGGY ANTOCIANIN PROFILJA

### 5.1.1 Vizsgált meggyfajták szárazanyagtartalma

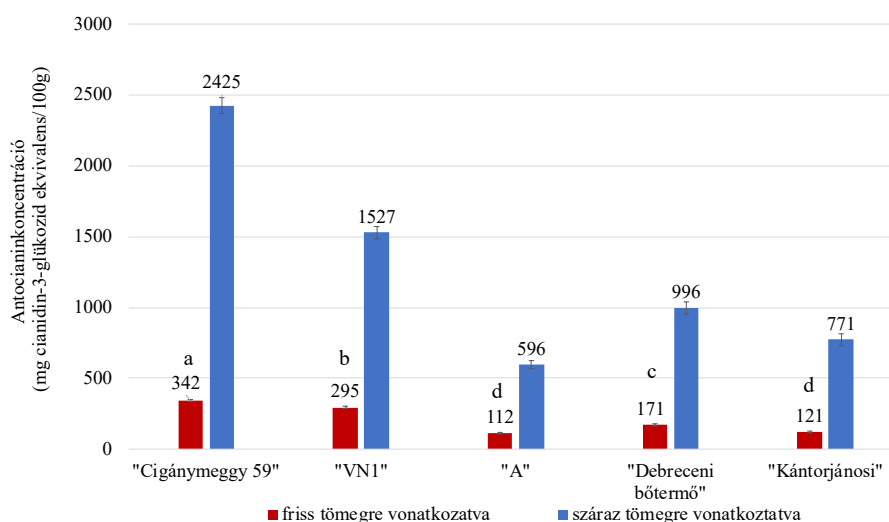
Meghatároztuk az általunk kiválasztott magyarországi meggyfajták (‘Cigánymeggy 59’, ‘VN1’, ‘A’, ‘Debreceni bőtermő’, ‘Kántorjánosi’) szárazanyagtartalmát, az eredményeik az 1. táblázatban találhatók. A szárazanyagtartalom tudományos szempontból nem jelentős információ, de az élelmiszeripar számára nagyon fontos, hisz minél nagyobb az adott gyümölcs szárazanyagtartalma, annál jobb az eltarthatósága. Mégis, a szárazanyag-tartalom meghatározására azért került sor, hogy a kapott eredmények száraz tömegre is megadhatóak legyenek. Így az eredményeinket könnyebb összevetni az irodalomban megjelent eredményekkel.

**1. táblázat:** A vizsgált meggyfajták szárazanyagtartalma %-ban kifejezve

| Vizsgált meggyfajták | Fajtakör     | Szárazanyagtartalom (%) |
|----------------------|--------------|-------------------------|
| Cigánymeggy 59       | Cigánymeggy  | 14,1                    |
| VN1                  | Bosnyák      | 19,3                    |
| A                    | Kántorjánosi | 18,8                    |
| Debreceni bőtermő    |              | 17,2                    |
| Kántorjánosi         |              | 15,7                    |

### 5.1.2 Antocianin-tartalom meghatározása pH-differenciál módszerrel és SPE izolálással

A vizsgált meggyfajtákból meghatároztuk az összes antocianinkoncentrációt pH differenciál módszerrel. Eredményeinket az 7. ábra foglalja össze. A kapott eredményeket száraz és friss tömegre vonatkoztatva is kifejeztük.



**7. ábra:** Antocianinkoncentráció (mg cianidin-3-glükózid ekvivalens/100g) meghatározása pH differenciál módszerrel.

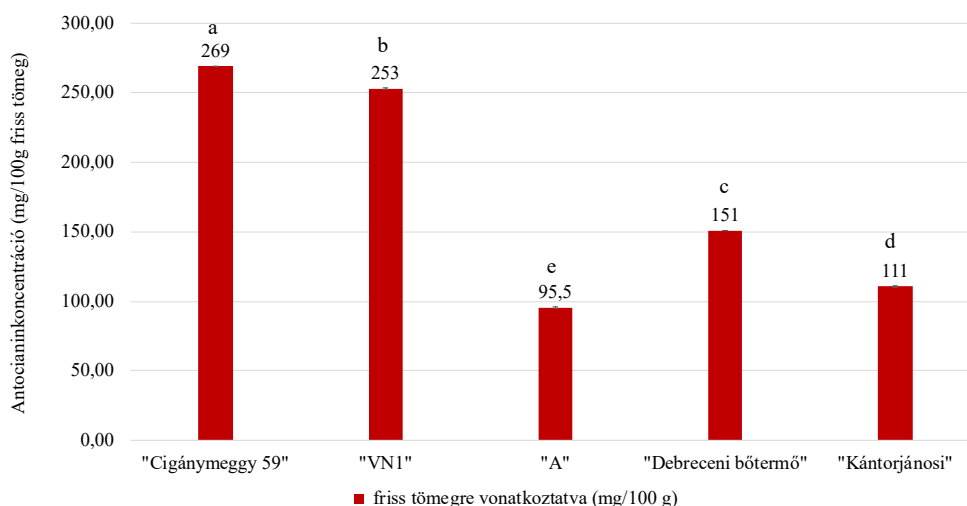
Jelmagyarázat: Az oszlop tetején az eltérő betűk a szignifikáns különbséget mutatják, melyet egyszempontú ANOVA teszttel, ( $p < 0,05$ ) határoztuk meg. Az adatokat, átlag  $\pm$  szórás (SD) formájában adjuk meg.

A kétféle tájfajtakör-höz tartozó fajták jelentősen eltérő antocianin koncentrációval jellemezhetőek. A 'Bosnyák' fajtakörhöz tartozó 'VN1' fajta kiemelkedően magas antocianinkoncentrációval jellemezhető: 295 mg/100g friss tömegre vonatkoztatva.

Meglepetésünkre a cigánymeggy klónok közül megvizsgált 'Cigánymeggy 59' -nél szintén magas antocianin koncentrációt tapasztaltunk: 342 mg/100g friss tömegre vonatkoztatva. A 'Cigánymeggy 59' fajta friss tömegre vonatkoztatott antocianinkoncentráció szignifikánsan különbözik a 'Bosnyák' fajtakörhöz tartozó 'VN1' és a 'Kántorjánosi' tájfajtakörhöz tartozó fajtáktól ( $p < 0,05$ ). Továbbá azt is megállapítottuk, hogy a 'VN1' fajta friss tömegre vonatkoztatott antocianinkoncentráció szignifikánsan különbözik a cigánymeggy klónokhoz tartozó 'Cigánymeggy 59' és a 'Kántorjánosi' tájfajtakörhöz tartozó fajtáktól. A 'Debreceni bőtermő', a 'Kántorjánosi' és az 'A' fajták antocianin koncentrációja 171 mg/100g, 121 mg/100g, 112 mg/100g friss tömegre vonatkoztatva. Ezen eredmények esetében az egyszempontú ANOVA alapján a 'Debreceni bőtermő' antocianinkoncentráció szignifikánsan különbözik a 'VN1', a 'Cigánymeggy 59', valamint az 'A' és a 'Kántorjánosi' fajtáktól. 'A' és 'Kántorjánosi' fajták friss tömegre vonatkoztatott antocianinkoncentrációja szignifikánsan nem különbözött egymástól.

A közelmúltban megjelent tanulmányok hasonló eredményekről számoltak be, a 'Montmorency' és 'Balaton' fajták antocianinkoncentrációja 40-80 mg/100g (Wang és mts., 1997) vagy 170 mg/100g (Kirakosyan és mts., 2009), régiótól függően. Kisebb antocianinkoncentrációt mértek friss gyümölcsben, 35,0-63,35 mg/100g (Damar és Eksi, 2012). Nemzetközi irodalmakkal összehasonlítva eredményeinket, elmondhatjuk, hogy a gazdag fajtasortimenttel jellemezhető magyar fajták között van néhány, melyre rendkívül magas antocianintartalom jellemző, ide sorolható a 'Cigánymeggy 59' és a 'VN1' fajták. A 'Debreceni bőtermő', 'A' és a 'Kántorjánosi' fajtáknál hasonló antocianinkoncentrációt mértünk, mint az a korábbi irodalamokban is szerepel.

Az egyes fajták antocianintartalmát szilárd fázisú extrakcióval is izoláltuk. Az eredményeket a 8. ábra foglalja össze. Az eredményeket friss tömegrre vonatkoztatva adjuk meg. A 'Cigánymeggy 59' fajtának volt a legnagyobb az antocianinkoncentrációja 269 mg/100g. míg a 'VN1' fajta antocianintartalma 253 mg/100g volt. A nyírségi termőterületre jellemző fajtákról elmondható, hogy a 'Debreceni bőtermőben' mutatható ki legnagyobb mennyiségben antocianin, majd a 'Kántorjánosiban', végül az 'A' fajtában (rendre 151 mg/100g, 111 mg/100g, 95,5 mg/100g). Az értékek szignifikánsan eltérnek egymástól.



**8. ábra:** Antocianinkoncentráció (mg/100g) izolálása szilárd fázisú extrakcióval.

Jelmagyarázat: Az oszlop tetején az eltérő betűk a szignifikáns különbséget mutatják, melyet egyszempontú ANOVA teszttel, ( $p < 0,05$ ) határoztuk meg. Az adatokat, átlag  $\pm$  szórás (SD) formájában adjuk meg.

### 5.1.3 Magyarországi meggyfajták antocianin profiljának meghatározása UHPLC-vel

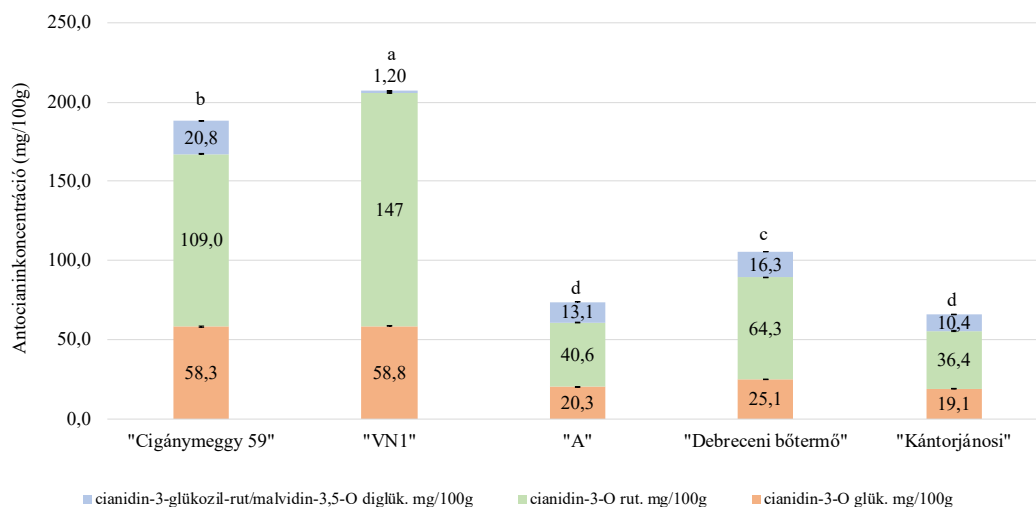
Számos tanulmány kiemelte a különböző antocianin vegyületek jelenlétét és fontosságát a különböző meggyfajtákban. A ‘Montmorency’ és a ‘Balaton’ fajtákban fő aglikonként a cianidin fordul elő, cianidin-3-O-glükozid, cianidin-3-O-glükozil-rutinozid, cianidin-3-O-rutinozid, cianidin-3-O-soporoizid formájában (Damar és Eksi, 2012; Garofulic és mts., 2013; Kirakosyan és mts., 2009; Lee és mts., 2008; Toydemir és mts., 2013). Egyéb antocianin aglikonokat is leírtak pl: a malvidint, (Dóka és mts., 2011; Ficzek és mts., 2011) de előfordulhat még a pelargonidin, peonidin, amiket szintén különböző glikozidok formájában azonosítottak (Blando és mts., 2004; Kirakosyan és mts., 2009; Mozetic és Trebse, 2014).

Az általunk vizsgált öt magyarországi meggyfajta antocianin profilját ultra nagynyomású folyadék kromatográfiás technikával határoztuk meg. Az antocianin profil meghatározásához felvettük az egyes komponensek kalibrációs görbáját, majd meghatároztuk az antocianinok minőségét és mennyiségét. Az antocianin koncentrációk függvényében ábrázoltuk a csúcs alatti területeket (2-4. melléklet), majd egyenest illesztettünk a kapott pontokra. Az egyenes egyenletéből kiszámoltuk a mintákban azonosított antocianin csúcsok koncentrációját (5. melléklet).

A vizsgált valamennyi fajtára jellemző, hogy a cianidin-3-rutinozid koncentrációja volt a legnagyobb. Mérési eredményeinket a 9. ábra foglalja össze. Jól látható, hogy a ‘Cigánymeggy 59’ és a ‘VN1’ fajtáknak kiemelkedően magas a cianidin-3-rutinozid koncentrációja (109 mg/100g; 147,00 mg/100g). Továbbá, a VN1’ fajtára jelentős cianidin-3-glükozid koncentráció is jellemző (58,8 mg/100g) szemben a többi fajtával. Ugyanezen fajta rendkívül kis koncentrációban tartalmaz cianidin-3-glükozil-rutinozidot/malvidin-3,5-O diglükozidot. Az ‘Kántorjánosi’ tájfajtakörhöz tartozó fajták közül a „Debreceni bőtermőnek” a legnagyobb a cianidin-3-rutinozid koncentrációja (64,3 mg/100g), a cianidin-3-glükozid koncentráció jellemző (25,1 mg/100g). Ugyanezen fajta 16,3 mg/100g koncentrációban tartalmaz cianidin-3-glükozil-rutinozidot/malvidin-3,5-O diglükozidot.

A ‘Cigánymeggy 59’ fajtánál UHPLC módszerrel mért fő antocianin komponensek koncentrációja szignifikánsan különbözik a ‘Bosnyák’ fajtakörhöz tartozó ‘VN1’ és a ‘Kántorjánosi’ tájfajtakörhöz tartozó fajtáktól. Továbbá az is látható, hogy a ‘VN1’ fajta UHPLC módszerrel mért fő antocianin komponensek koncentrációja szignifikánsan különbözik a ‘Cigánymeggy 59’ és a ‘Kántorjánosi’ tájfajtakörhöz tartozó fajtáktól. A

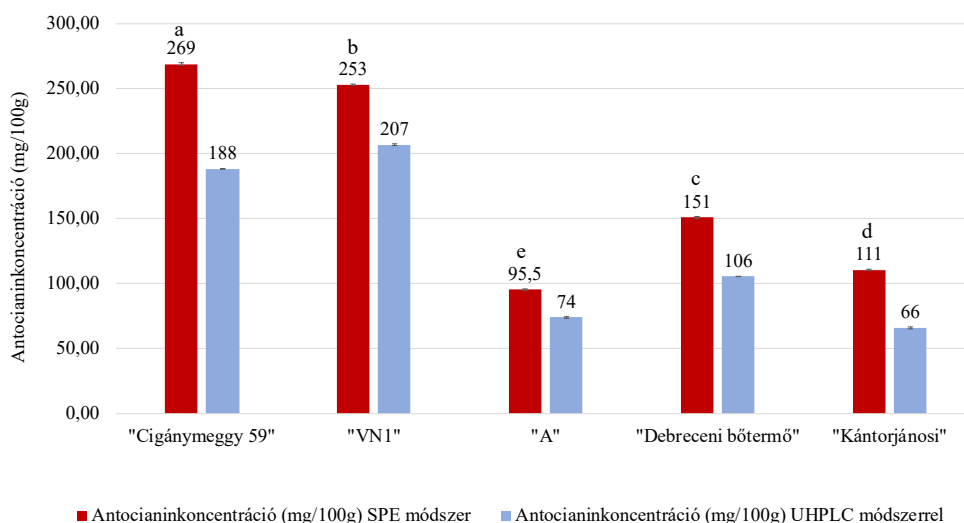
‘Debreceni bőtermő’ fajtában UHPLC módszerrel mért, fő antocianin komponensek koncentrációja szignifikánsan különbözik a többi fajtától.



**9. ábra:** A vizsgált meggyfajták fő antocianin komponensek koncentrációjának meghatározása UHPLC módszerrel. Jelmagyarázat: Az oszlop tetején az eltérő betűk a szignifikáns különbséget mutatják, melyet egyszempontú ANOVA teszttel, ( $p < 0,05$ ) határoztuk meg. Az adatokat, átlag  $\pm$  szórás (SD) formájában adjuk meg.

Az ‘A’ és a ‘Kántorjánosi’ fajták UHPLC módszerrel mért fő antocianin komponenseinek koncentrációi szignifikánsan nem különböznek egymástól ( $p < 0,05$ ).

Ezt követően összehasonlítottuk az egyes fajták szilárd fázisú extrakcióval izolált antocianin koncentrációját és ugyanazon fajta UHPLC módszerrel mért antocianin koncentráció értékeit. Az eredményeket a 10. ábrán mutatjuk be, az értékek friss tömegre vonatkoztatottak.



**10. ábra:** A szilárd fázisú extrakcióval izolált és az UHPLC módszerrel mért antocianin koncentrációkösszehasonlítása. Jelmagyarázat: Az oszlop tetején az eltérő betűk a szignifikáns különbséget mutatják, melyet egyszempontú ANOVA teszttel, ( $p < 0,05$ ) határoztuk meg. Az adatokat, átlag  $\pm$  szórás (SD) formájában adjuk meg.

Az egyszempontú varianciaanalízis alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált meggyfajták szilárd fázisú extrakcióval izolált antocianin koncentráció eredménye szignifikánsan különbözik ugyanazon fajta UHPLC módszerrel mért antocianin koncentráció értékeitől ( $p < 0,05$ ). A SPE-módszerrel meghatározott antocianin koncentrációk nagyobb átlagértéket mutattak. Ennek az lehet a magyarázata, hogy az alkalmazott extrakciós eljárás során a meggy gyümölcsből kioldjuk a víz és a metanol oldékonyságot mutató komponenseket is. A szilárd fázisú extrakció során a fokozatos tisztítási protokoll szerint csak a végső metanollal lemosható komponensek kerülnek bepárolásra. Ezeket mi piros színűnek látjuk, de az antocianinok mellett más flavonolokat is tartalmaznak pl: kaemferol, quercetin, isorhamnetin-3-rutinozid (Kirakosyan és mts., 2010; Nemes és mts., 2018). Ezen kívül más biológiailag aktív vegyületek is jelen lehetnek a kivonatban pl: melatonin. Viszont amikor a szilárd fázisú extrakcióval történő izolálás után a mintákat valamennyi esetben UHPLC-s módszerrel analizáltuk a fő célunk az 535 nm-n detektálható antocianinok vizsgálata volt, de természetesen 340 nm-n más úgynevezett antocianin prekursor vegyületeket szintén detektáltunk, de ezek feltérképezése nem képezik ezen dolgozat részét.

#### 5.1.4 A meggy fő komponenseinek azonosítása MALDI-TOF tömegspektrométerrel

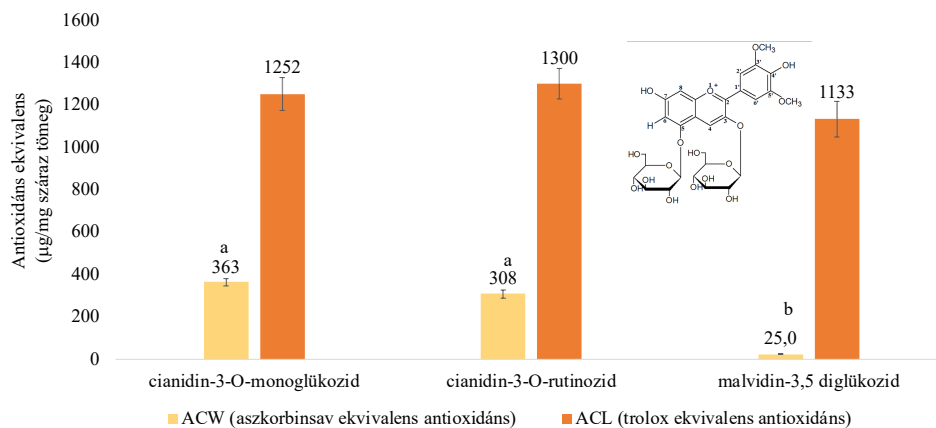
A tisztított antocianin extraktumokat tovább tisztítottuk preparatív HPLC-s technikával, és MALDI-TOF MS elemzéssel három fő komponenst azonosítottunk m/z értékük alapján: cianidin-3-glükózil-rutinozid 757,5 Da, cianidin-3-glükózidot 449,1 Da, és cianidin 3-rutinozidot 595,6 Da. Ezen kívül számos kisebb antocianin összetevőt mutattunk ki a meggykivonatok HPLC-frakciókból. A 2. táblázat összegzi a meggykivonatból MALDI-TOF MS spektrummal azonosított antocianin komponensek mért és számított m/z értékeit. A MALDI-TOF MS spektrumok a 6. mellékletben láthatóak.

2. táblázat: Meggykivonatból MALDI-TOF MS spektrummal azonosított antocianinok mért és számított m/z értékei

| Antocianin                 | Képlet                                          | Számított tömeg (Da) | Retencióssor | Mért tömeg (Da) |                       |                      |
|----------------------------|-------------------------------------------------|----------------------|--------------|-----------------|-----------------------|----------------------|
|                            |                                                 |                      |              | M <sup>+</sup>  | [M-H+Na] <sup>+</sup> | [M-H+K] <sup>+</sup> |
| delphinidin-glükózid       | C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub> | 465.38               | 1            | 465.4           | 487.4                 | 503.3                |
| cianidin-glükózilrutinozid | C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> O <sub>20</sub> | 757.66               | 2            | 757.5           | 779.4                 | -                    |
| malvidin-diglükózid        | C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> O <sub>17</sub> | 655.58               | 3            | 655.5           | 677.5                 | 693.5                |
| cianidin-glükózid          | C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> | 449.38               | 4            | 450.3           | 471.9                 | -                    |
| cianidin-rutinozid         | C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub> | 595.52               | 5            | 595.9           | 617.5                 | -                    |
| petunidin-glükózid         | C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> | 479.41               | 6            | 479.4           | 501.3                 | 517.3                |
| malvidin-glükózid          | C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub> | 493.44               | 7            | 493.3           | 515.4                 | 531.3                |
| peonidin-rutinozid         | C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> O <sub>15</sub> | 609.55               | 8            | 609.2           | 631.2                 | -                    |
| malvidin-rutinozid         | C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> O <sub>16</sub> | 639.57               | 9            | 639.3           | 661.3                 | 677.4                |

## 5.2 ANTIOXIDÁNS KAPACITÁS VIZSGÁLATA

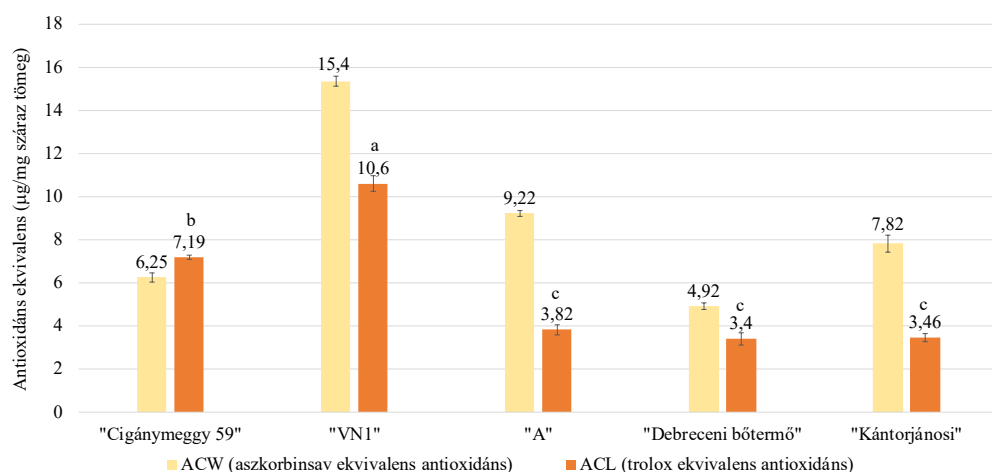
A magyarországi meggyfajtákra jellemző fő antocianin komponensek azonosítására alkalmazott standardok antioxidáns kapacitását fotokemiluminescens módszerrel megmértük, eredményeinket az 11. ábrán mutatjuk be. A vízdékony antioxidáns kapacitás méréshez a mintákat minden egyes mérés előtt vízben oldottuk, míg a zsírdékony antioxidáns kapacitás mérésnél a mintákat metanolba oldottuk. A cianidin-3-O-monoglükozid és a cianidin-3-O-rutinozid vízdékony antioxidáns kapacitása, valamint a malvidin-3,5-diglükozid értékei szignifikáns különbséget mutattak. A vizsgált antocianin standardok zsírdékony antioxidáns kapacitás eredményeinkről elmondható, hogy az ACL eredményei közötti eltérés egymáshoz képest nem volt szignifikáns ( $p < 0,05$ ). Ez azzal magyarázható, hogy ezen struktúrával rendelkező molekulák, jobb oldékonyságot mutatnak alkoholban, mint vízben (Nemes és mts., 2018). Az egyes standardok ACW és ACL értékekből leképeztük az egyes standardok összes antioxidáns kapacitását, a malvidin-3,5-diglükozid értékei szignifikánsan különböztek a cianidin-3-O-monoglükozid és a cianidin-3-O-rutinozid összes antioxidáns kapacitásától ( $p < 0,05$ ). Ezen eredményekre magyarázatot adhat a kálcinon vázon megjelenő eltérő funkciócsoportok. Több tanulmány részletesen beszámol arról, hogy az antocianinok B-gyűrűjén az  $R^{3'}$  és  $R^{5'}$  pozícióban előforduló OH és H csoportok fokozzák a molekulára jellemző antioxidáns kapacitást (Silva és mts., 2002; Muselik és mts., 2007), míg a malvidin-3,5-diglükozid esetében az  $R^{3'}$  és  $R^{5'}$  pozíciókban  $OCH_3$  csoport jellemző. Továbbá Silva és munkatársai 2002-ben megjelent tanulmányában arra is kitér, hogy az antocianinok A-gyűrűjének  $R^3$  és  $R^5$  pozícióban előforduló OH csoportok tovább fokozzák a molekula antioxidáns kapacitását. Mint ismeretes a malvidin-3,5-diglükozid molekulához a korábban említett pozíciókban 1-1 glükóz molekula kapcsolódik.



**11. ábra:** Antocianin standardok fotokemilumineszcens módszerrel meghatározott víz- és zsírolékony antioxidáns kapacitása. Jelmagyarázat: Az oszlop tetején az eltérő betűk a szignifikáns különbséget mutatják, melyet egyszempontú ANOVA teszttel, ( $p < 0,05$ ) határoztuk meg. Az adatokat, átlag  $\pm$  szórás (SD) formájában adjuk meg.

### 5.2.1 Meggyfajták antioxidáns kapacitásának vizsgálata

Tanulmányokból ismert, hogy a piros bogyós és csonthéjas gyümölcsök magas antioxidáns kapacitással rendelkeznek. Öt magyarországi meggyfajta zsír- és vízlökony antioxidáns kapacitását a 12. ábrán mutatjuk be száraz tömegről vonatkoztatva.

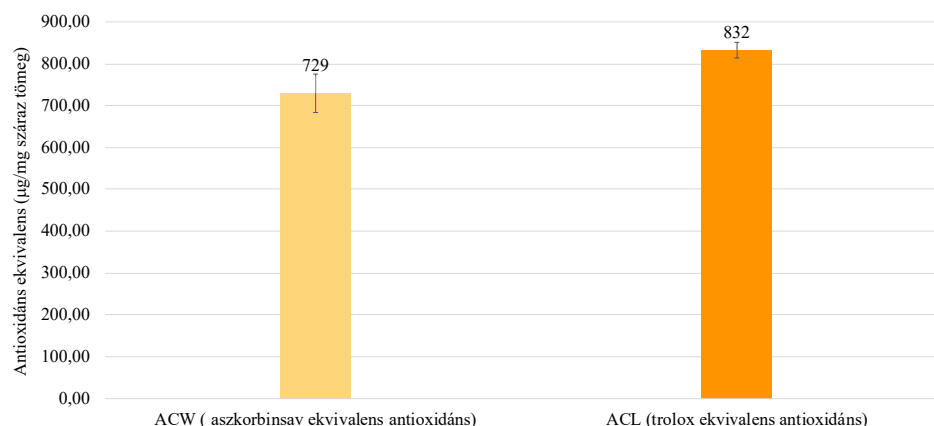


**12. ábra:** Meggyfajták fotokemilumineszcens módszerrel meghatározott víz- és zsírolékony antioxidáns kapacitása. Jelmagyarázat: Az oszlop tetején az eltérő betűk a szignifikáns különbséget mutatják, melyet egyszempontú ANOVA teszttel, ( $p < 0,05$ ) határoztuk meg. Az adatokat, átlag  $\pm$  szórás (SD) formájában adjuk meg.

A vizsgált fajták közül kiemelkedően magas víz- (ACW) és zsíroldékony antioxidáns kapacitása (ACL) van a 'Cigánymeggy 59' (melynek értéke 6,25 µg aszkorbivsav ekvivalens/mg és 7,19 µg trolox ekvivalens/mg) és a 'VN1' (melynek értéke 15,4 µg aszkorbivsav ekvivalens/mg és 10,6 µg trolox ekvivalens/mg) fajtáknak. Az 'A', 'Debreceni bőtermő', valamint a 'Kántorjánosi' fajtáknál egyaránt jellemző, hogy a vízzoldékony antioxidáns kapacitásuk nagyobb, mint a zsíroldékony. A 'Cigánymeggy 59' fajta zsíroldékony antioxidáns kapacitása szignifikánsan különbözik a 'VN1' és a 'Kántorjánosi' tájfajtakörhöz tartozó fajtáktól. A 'VN1' fajta zsíroldékony antioxidáns kapacitása szignifikánsan különbözik a cigánymeggy klónokhoz tartozó 'Cigánymeggy 59' és a 'Kántorjánosi' tájfajtakörhöz tartozó fajtáktól. Ugyanakkor a 'Kántorjánosi' tájfajtakörhöz tartozó fajták zsíroldékony antioxidáns kapacitásai szignifikánsan nem különböznek egymástól. Valamennyi meggyfajta vízzoldékony antioxidáns kapacitása egymáshoz képest szignifikánsan eltér ( $p < 0,05$ ). Ennek oka, hogy a meggyre, nagy mennyiségű vízben oldódó vitamint (C, B1, B2, B3, B6) halmoz fel (Ferretti és mts., 2010; Jacob és mts., 2003), amelyek közül a C-vitaminnak a legnagyobb a szuperoxid gyök elimináló képessége. Ráadásul a gallotanninok, a melatonin és kis molekulatömegű fenolos vegyületek szintén felelősek a nagy vízzoldékony antioxidáns tulajdonságért.

A korábbi vizsgálati eredményekből megállapítható, hogy a 'VN1' fajtára jellemző a legnagyobb antocianinkoncentráció. Így a további vizsgálatainkhoz ezen meggyfajtából készített kivonatot alkalmaztuk. Megvizsgáltuk a 'VN1' fajtából szilárd fázisú extrakcióval izolált antocianinok víz- és zsíroldékony antioxidáns kapacitását, az eredmények a 13. ábrán láthatók.

A szilárd fázisú extrakcióval izolált antocianinok víz- és zsíroldékony antioxidáns kapacitás eredményei közötti eltérés egymáshoz képest nem volt szignifikáns ( $p > 0,05$ ).



**13. ábra:** Szilárd fázisú extrakcióval izolált antocianin víz és zsírdékony antioxidáns kapacitásának vizsgálata fotokemilumineszcens módszerrel. Az eltérés egymáshoz képest nem szignifikáns  $p > 0,05$  egyszempontú ANOVA teszt alapján. Az adatokat, átlag  $\pm$  szórás (SD) formájában adjuk meg.

## 5.3 A MEGGYKIVONATOK ÉS A FŐ ANTOCIANIN KOMPONENSEK INHIBICIÓS VIZSGÁLATA *IN VITRO*

### 5.3.1 $\alpha$ -Amiláz gátlás meghatározása

Megvizsgáltuk az egyes antocianin komponensek inhibíciós aktivitását. Az  $\alpha$ -amiláz egy endoenzim, így az általa katalizált reakció, a Michaelis-Menten egyenlettel írható le.

$$v_0 = \frac{v_{\max} [S]}{K_M \left( 1 + \frac{1}{K_{EI}} [I] \right) + [S] \left( 1 + \frac{1}{K_{ESI}} [I] \right)}$$

ahol:  $v_0$ : a kezdeti sebesség az inhibitor jelenlétében és jelenléte nélkül

$v_{\max}$ : a limitált maximális sebesség

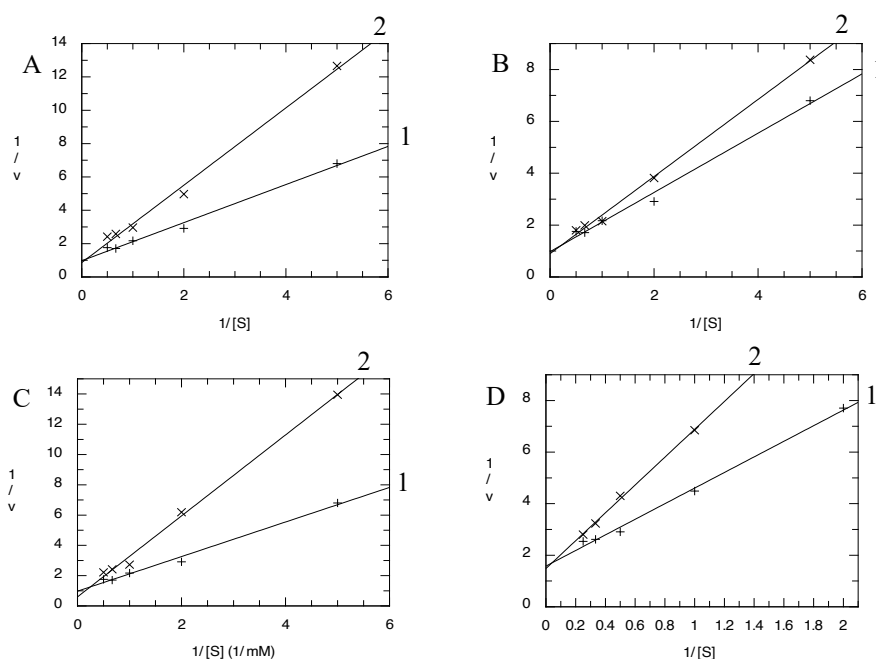
[S] és [I]: a szubsztrát és az inhibitor koncentrációk

$K_{EI}$  és  $K_{ESI}$ : az inhibítort tartalmazó komplexek disszociációs konstansai

Meghatároztuk a meggykivonatok és egyes antocianinok gátló aktivitását humán nyálamiláz (EC 3.2.1.1) jelenlétében GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztráton (Lineweaver-Burk

diagramok és  $IC_{50}$  mérések alkalmazásával). A gátlás típusát különböző szubsztrát koncentrációkban határoztuk meg, különböző inhibitorok jelenlétében és anélkül.

A Lineaweaver-Burk-féle ábrázolásban a Michealis-Menten egyenletnek megfelelő telítési görbe, kettős reciprok ábrázolása látható a 14. ábrán.



14. ábra: Az inhibitor vegyületek jelenlétében és távollétében a kettős reciprok ábrázolásban kompetitív gátlás látható: ahol az inhibitor a cianidin-3-O-glükozid (A), a malvidin-3-O-glükozid (B), a malvidin-3,5- O-diglükozid (C) és cianidin-3-rutinozid (D) volt.

Ahol a kezdeti sebesség reciprokát ( $1/v$ ) ábráztuk, a szubsztrát koncentráció reciprok ( $1/s$ ) függvényében. Az 1-es számmal jelölt egyenes inhibitor nélkül, míg a 2-es számmal jelölt egyenes inhibitor mellett mutatja az enzim működést. Az 1-es számmal jelölt egyenesre jellemző, hogy az általa meghatározott egyenes meredeksége rendre alacsonyabb, mint az inhibitorot tartalmazó reakcióelegyre jellemző egyenes. Látható, hogy a két egyenes kezdő pontja ugyanaz a pont, így a  $V_{max}$  reciprok érték is ugyanaz. Az általunk vizsgált antocainin komponensek tisztán kompetitív módon képesek gátolni az  $\alpha$ -amiláz aktivitását. Ami azt jelenti, hogy az inhibitor molekulák a kötődés során a szubsztráttal versengenek, hiszen csak az egyik kötődhet az enzim aktív centrumához. Ez azt is jelenti, hogy ha növeljük a szubsztrát koncentrációt, akkor az enzim-szubsztrát komplex kialakul.

A tiszta antocianin struktúrák és az egyes meggy extraktumok gátlás hatékonyságának jellemzésére meghatároztuk az IC<sub>50</sub> értéket.

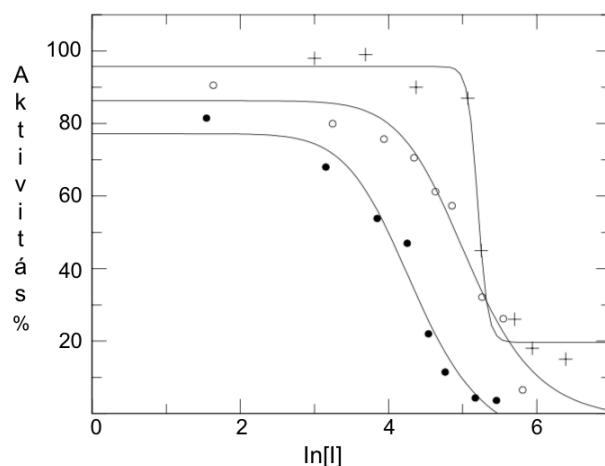
IC<sub>50</sub> értéknek nevezzük az inhibitor azon értékét, amely 50%-kal gátolja az enzim aktivitását, melyet az inhibitor koncentráció és a kiváltott reakciósebesség csökkenése alapján számítottuk. Az eredményeinket a 3. táblázatban mutatjuk be. Látható, hogy a legnagyobb inhibíciós aktivitással a malvidin-3,5-diglükózid rendelkezik.

**3. táblázat:** A meggykivonatok és antocianin komponensek, mint HSA inhibitorok IC<sub>50</sub> értékei  
(Az értékek három ismételhető mérés átlaga ± standard errors. nd: nem detektálható).

| Inhibitor                      | Inhibíció tipusa  | IC <sub>50</sub> (μM) | IC <sub>50</sub> (μg/mL) | Számított IC <sub>50</sub> (μg/mL) |
|--------------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------------------|
| cianidin-3-glükózid            | Kompetitív        | 180 ± 20              | 84 ± 10                  |                                    |
| cianidin-3-rutinozid           | Kompetitív        | 200 ± 24              | 126 ± 15                 |                                    |
| malvidin-3-glükózid            | Kompetitív        | 675 ± 73              | 356 ± 39                 |                                    |
| <b>malvidin-3,5-diglükózid</b> | <b>Kompetitív</b> | <b>80 ± 10</b>        | <b>55 ± 7</b>            |                                    |
| <b>Cigánymeggy 59</b>          | <b>Kompetitív</b> | <b>nd</b>             | <b>330 ± 45</b>          | <b>377</b>                         |
| VN1                            | Kompetitív        | nd                    | 610 ± 50                 | 525                                |
| A                              | Kompetitív        | nd                    | 790 ± 55                 | 836                                |
| Debreceni bőtermő              | Kompetitív        | nd                    | 370 ± 42                 | 1028                               |
| Kántorjánosi                   | Kompetitív        | nd                    | 892 ± 62                 | 1092                               |

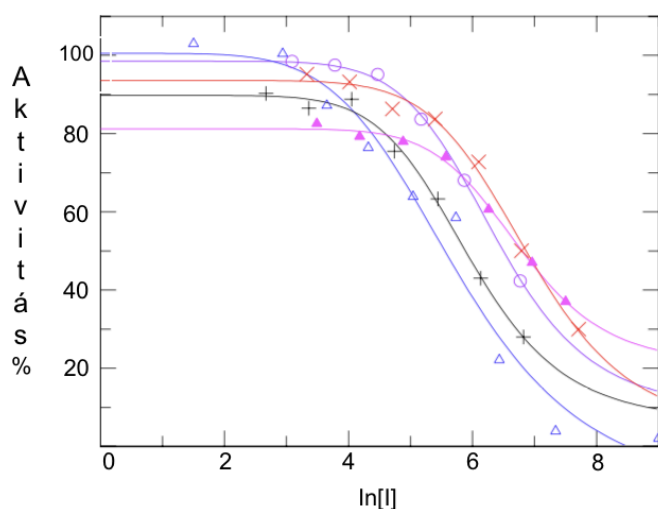
Ezt követően dózis-hatás görbét vettük fel, ahol meghatároztuk az inhibitor vegyületek hatását a humán nyálamiláz által katalizált hidrolízisre. Ezeket a vizsgálatokat állandó enzim- és szubsztrát koncentrációk mellett végeztük, de az inhibitor koncentrációk változtak. A kezdeti sebességet a mért kinetikai görbék meredeksége alapján számítottuk, és az aktivitást az inhibitor koncentráció függvényében ábrázoltuk. A görbéket standard négy paraméterű logisztikus nemlineáris regressziós analízissel értékeltük.

A 15. ábrán láthatók az egyes antocianin komponensekhez tartozó dózis-hatás görbék. A dózis -hatás görbe szerint az aktivitás az inhibitor koncentráció növekedésével párhuzamosan csökken. A grafikus kép alapján a malvidin-3,5-diglükózid inhibíciós hatása a legnagyobb.



**15. ábra:** Az antocianin inhibitorok dózis-hatás görbe grafikus ábrázolása.  
Jelmagyarázat: cianidin-3-O-glükózid (○) and malvidin-3,5-O-glükózid (●) cianidin-3-O-rutinozid (+),  
I inhibitor.

Hasonlóképpen megvizsgáltuk az egyes meggykivonatok 3. táblázatba foglalt IC<sub>50</sub> értékét. Az eredmények a 16. ábrán láthatók. A ‘Cigánymeggy 59’ és a ‘Debreceni bőtermő’ jobb inhibitorok, mint a vizsgálatban szereplő egyéb meggykivonatok.



**16. ábra:** A meggykivonat inhibitorok dózis-hatás görbe grafikus ábrázolása  
‘Cigánymeggy 59’ (Δ), ‘Debreceni bőtermő’ (+), ‘VN1’ (○), ‘A’ (▲), ‘Kántorjánosi’ (×).  
I inhibitor

A ‘Cigánymeggy 59’ jó inhibitor tulajdonsága korrelál a magas antocianintartalmával, míg a ‘Debreceni bőtermő’ fajtánál jobb gátlási aktivitást mértünk, mint ahogy azt antocianintartalmából számoltuk, ami más olyan vegyületek jelenlétére utal, amelyek gátló hatással rendelkeznek. A kísérletben szereplő másik három meggykivonat dózis-hatás görbéi hasonló alakúak és hasonlóan nagyobb IC<sub>50</sub> értékkel jellemezhetőek, míg a

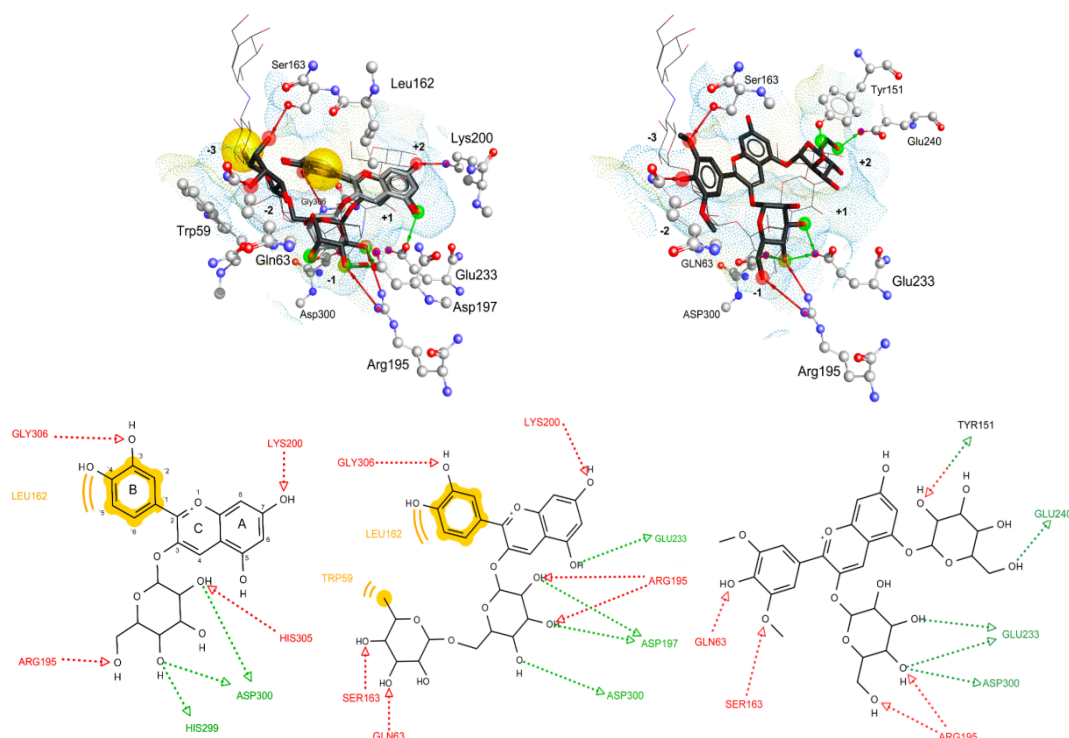
‘VN1’ meggyfajtának alacsonyabb a gátló hatása, mely a malvidin-3,5-diglükozid hiányával magyarázható.

### **5.3.2 Az antocianinok bekötődésének modellezése az $\alpha$ -amiláz enzim aktív centrumába**

Vizsgálataink nem szolgáltatnak elegendő magyarázatot arra vonatkozóan, hogy a ‘VN1’ fajtából készített meggykivonatnak, miért olyan alacsony az inhibíciós aktivitása. Hiszen korábbi vizsgálatainkból ismertük a kiemelkedően nagy antocianin koncentrációját. Mint ismeretes a humán nyálamiláz aktív helye 4 glikon és 3 aglikon alhelyből áll (Kandra és mtsai., 2003), minnél jobb egy inhibítor molekula kötődése az enzim aktív helyén, annál nehezebb a szubsztrátnak kiszorítani a versengés során.

A berlini Freie University, Gyógyszerészeti Intézet, Gyógyszerészeti és Gyógyászati Kémia Tanszékről Dr. Jérémie Mortier és Dr. Gerhard Wolber által végzett *in silico* modellezés végeztek. Megvizsgálták az általunk tanulmányozott antocianin struktúrák HSA aktív centrumához való kötődését. Az eredmények a 17. ábrán láthatóak. Az összehasonlításhoz akarbózt használtak referencia inhibitorként ( $IC_{50} = 0,5 \mu M$ ). Az akarbóz kötődésének vizsgálatához az 1MFV kódjelű PDB adatbázisban megtalálható HSA szerkezetet (Ramasubbu és mts., 2003) használták fel (Wolber és mts., 2006; Wolber és Langer, 2005; Wolber és mts., 2008). Az akarbóz az aktív helyre orientálódik, -3 és +2 közötti kötőhelyekre (Lo Piparo és mts., 2008). A vizsgált antocianinokkal kapott konformációkat LigandScout 3.1 program segítségével elemezték.

A cianidin-3-glükózid ( $IC_{50} \sim 200 \mu M$ ) és a cianidin-3-rutinozid ( $IC_{50} = 200 \mu M$ ) esetében kiválasztott konformációk rendkívül hasonló kötési módot mutatnak.



**17. ábra:** A cianidin vegyületek javasolt kötési módjai a HSA aktív centrumában 3D ábrázolással. cianidin-3-glükózid (szürkevel jelölve) és cianidin-3-rutinozid (feketével jelölve) jobbra a malvidin-3,5-diglükózid. Az akarbózt vonalként ábrázolják, és a kötőhelyeket negatív és pozitív számként jelölik. A sárga gömbök hidrofób kapcsolatokat jeleznek, a zöld és a piros nyilak pedig hidrogén kötések. A változó méretű aminosav-jelölés megfelel az üregben lévő mélységüknek. A 2D ábrázolással (lent) cianidin-3-glükózid, cianidin-3-rutinozid és malvidin-3,5-diglükózid vegyületeket láthatóak.

A cianidin-3-glükózid C gyűrűjéhez kapcsolódó glükózegység 2-, 4- és 6-OH csoportjai H-kötésekkel kapcsolódnak a His305, Asp300, His299 és Arg195 aminosavakhoz. Hasonlót tapasztaltak a cianidin-3-rutinozid C gyűrűjéhez kapcsolódó glükózegység 2-, 3- és 4-OH csoportok hidrogén kötéssel kötődnek az Arg195, az Asp197 és az Asp300 aminosavakhoz, valamint a kalkonváz A gyűrűjének 5-OH csoportja hidrogén kötéssel kapcsolódik a Glu233 aminosavhoz. Ezenkívül a cianidin-3-glükózid és cianidin-3-rutinozidra jellemző, hogy a kalkonváz B gyűrűje és a Leu162 közötti hidrofób kapcsolat révén stabilizálódik, és az A gyűrű 7-es pozícióban lévő OH- csoportja és Lys200 között H-kötés figyelhető meg. A cianidin-3-glükózid és a cianidin-3-rutinozid 6-deoxiglükóz egység 6-metilcsoportja hidrofób kapcsolatot hoz létre a Trp59 aromás gyűrűjével, továbbá ezen glükóz egység 3-OH és 4-OH csoportjai H-kötést a Gln63 és Ser163 aminosavakkal.

A malvidin-3,5-diglükózid ( $IC_{50} = 70 \mu M$ ) vizsgálata azt mutatta, hogy a vegyület legjobb kapcsolódási pozíciója körülbelül  $60^\circ$  -kal elfordul a cianidin-3-glükózid és a cianidin-3-rutinozidhoz képest, ahogy azt a 17. ábra bemutatja.

Mint minden flavonoid szerkezet esetében, az antocianinok B gyűrűje kulcsfontosságúnak tűnik az  $\alpha$ -amiláz gátlása szempontjából (Lo Piparo és mts., 2008). Vizsgálataik bizonyítják, hogy a malvidin-3,5-diglükózid B gyűrűjének orientációja megfelelő módon foglalja el a -2 és -3 pozíciókat, és ezért fokozza az optimális enzimgátláshoz szükséges kölcsönhatásokat. Ebben a régióban a malvidin-3,5-diglükózid B gyűrűben lévő 4'-OH csoport H-kötést mutat a Gln63-mal, amely nem alakul ki a cianidin-3-glükózid és cianidin-3-rutinozid esetében. A HSA -1, -2 és -3 alhelyeinek betöltöttsége központi szerepet játszik a katalitikus aktivitásban (Lo Piparo és mts., 2008).

A kiválasztott dokkolási konformációban a B gyűrű a -2, -3 alhelyekre és a 4'-OH és 5'-metoxicsoporthoz irányul, és a Gln63 és Ser163 oldalláncokkal H-kötéseket képez. Ezenkívül ez a különböző orientáció a C gyűrűhöz kapcsolt glükózegységet irányítja a -1 alhely felé, amely a 3-, 4- és 6-OH csoportok H-kötéseit képezi a Glu233, Asp300 és Arg195 oldallánccal. Az A gyűrűhöz kapcsolt glükóz egység a +2 alhellyel H-kötéseket hoz létre a 2-OH és a 6-OH csoportok és a Tyr151 és Glu240 oldalláncok között.

A malvidin-3,5-diglükózid orientációja magyarázatot adhat arra, hogy miért jobb a hatékonysága, mint a cianidin-3-glükózidnak és cianidin-3-rutinozidnak. Ez arra enged következtetni, hogy az  $\alpha$ -amiláz gátlás szempontjából fontos a B gyűrű orientációja a malvidin-3,5-diglükózid -2, -3 alhelyek felé.

Az *in silico* vizsgálatok szerint a malvidin-3,5-diglükózid molekula stabilan illeszkedik az enzim aktív centrumába.

Ezzel magyarázható az *in vitro* vizsgálatok eredményei is. Korábban már bemutatásra került, hogy a 'Cigánymeggy 59' meggyfajtából készített meggykivonat inhibíciós aktivitása volt a legnagyobb, mely jól magyarázható a nagyobb malvidin-3,5-diglükózid koncentrációjával, szemben a többi meggyfajttal.

Ez az oka annak, hogy a 'VN1' meggyfajtából készített meggykivonat, nem olyan jó inhibítor az  $\alpha$ -amiláz enzimnek, mely magyarázható a malvidin-3,5-diglükózid alacsony koncentrációjával.

## **5.4 A MEGGYKIVONAT-TARTALMÚ RÁGÓGUMI HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA PILOT CLINICAL STUDY-BAN**

### **5.4.1 A nyugalmi és inger nyál vizsgálata**

A nyál termelésében három nagy nyálmirigy (fültőmirigyek, nyelv alatti mirigy és az állkapocs alatti mirigy) ill. még kis nyálmirigyek is részt vesznek. Termelődését szimpatikus és paraszimpatikus idegrendszeri hatások befolyásolják. Szimpatikus hatásra kis térfogatú, fehérjében gazdag nyál termelődik, míg paraszimpatikus hatásra nagy víztartalmú, nagy mennyiségű nyál keletkezik. A szimpatikus és paraszimpatikus aktiváció mindig szimultán, egymást erősítve fokozza a folyadék és fehérje szekréciót (Proctor és Carpenter, 2007). A keletkező szekréciót összetételük (ionok, bikarbonát) alapján két csoportba sorolhatjuk. Megkülönböztetünk nyugalmi nyálat és stimulált nyálat. A stimulált nyálra jellemző, hogy az ionok és bikarbonát koncentrációja nagyobb, mint a nyugalmi nyálban. Mint ismeretes, a nyálban előforduló kalcium és foszfát jelentős szerepet játszik a fogzománc remineralizációjában (Kidd, 2005). Ezen remineralizációs folyamat pH= 5,5 felett megy végbe, ezért a stimulus hatására megnövekedő bikarbonátszint kulcsfontosságú tényezőnek mondható a fogszuvasodás kialakulásának szempontjából (Kidd, 2005).

Ha a pH kisebb mint 5,5, akkor a fogzománc oldódni kezd. A szénhidrátban gazdag ételek és az alacsony pH-jú italok, mint a szénsavas üdítők, gyümölcslevek és a bor, mind csökkenti a pH-t. Ilyen körülmények között a kalciumfoszfát oldódik, mely a fogzománc demineralizációját okozza. A nyálban előforduló bikarbonát ezen mechanizmus semlegesítésében jelentős szerepet játszik.

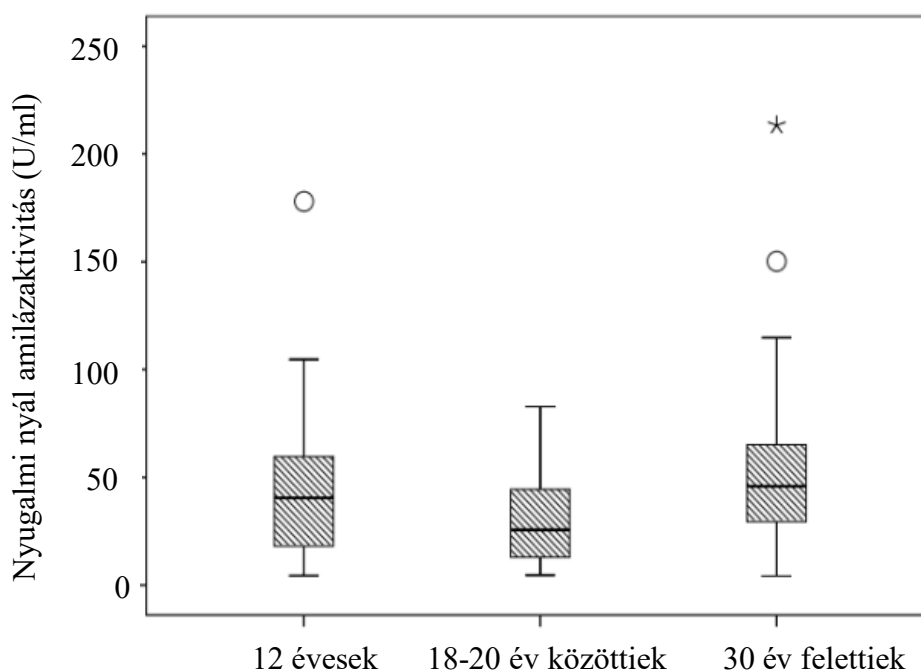
A mintagyűjtés során fontos szempont volt, hogy a kísérletbe bevont valamennyi páciensről nyugalmi nyál és stimulált nyálminták gyűjtése is megvalósuljon. Ezt azért találtuk fontosnak, mert ismeretes, hogy a nyál összetétele jelentős egyéni eltéréseket mutat, ennek okai között szerepel számos rövid vagy hosszú távon hatást gyakorló tényező ide sorolhatók a fizikális stressz hatások pl: sport, rendszeres testmozgás, ill maga a pszichés stressz pl: vizsgák, ezen kívül természetesen az étkezési szokásokkal kapcsolatos magatartás, életkor, nem szintén meghatározó és ezáltal egyedi, úgynevezett variábilis nyugalmi nyálamiláz szintek alakulhatnak ki. Így a vizsgálatban résztvevők nyugalmi nyál mintái saját kontroll mintának tekinthetők a kísérlet során.

Az eredményeink statisztikai elemzése igazolta, hogy a nyál amilázaktivitás (sAA), valamint a *S. mutans* telepszám nyugalmi nyálmintában nem változott a korral és a nemmel.

#### 5.4.2 A nyugalmi nyál aktivitása

A nyugalmi nyál amilázaktivitás vizsgálat eredményeinek statisztikai értékelése kor és nem szerint történt.

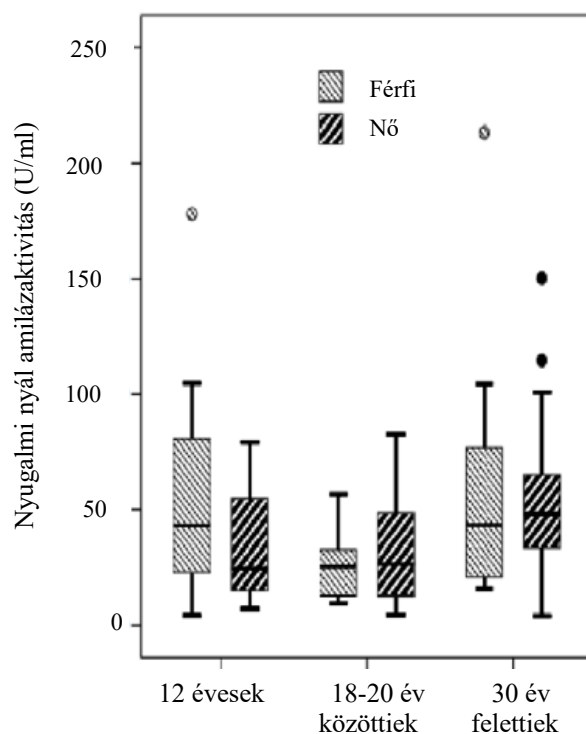
Az 18. ábra a három különböző korcsoportból származó önkéntesek nyugalmi nyálamiláz-aktivitását mutatja be az életkor függvényében. A három korcsoport nyugalmi nyál amilázaktivitása nem különbözik szignifikánsan egymástól (12 évesek:  $40,6 \pm 40,9$ ; 18-20 év közöttiek:  $31,2 \pm 22,6$ ; 30 év feletti:  $58,5 \pm 49,4$ ,  $p > 0,05$ ). A Kolmogorov-Smirnov teszt alapján normál eloszlás jellemző a csoportokra.



**18. ábra:** Különböző korcsoportok nyugalmi nyál amilázaktivitás kvantitatív összehasonlítása. Jelmagyarázat: az üres körök (○) atipikus értékeket képviselnek, a csillagok (\*) a szélső értékeket jelölik.

19. ábrán a három korcsoportból származó önkéntesek nyugalmi nyál amilázaktivitását mutatja be az életkor és a nem függvényében. Az ábrán az látható, hogy a nemek között nincs szignifikáns különbség a vizsgált korcsoportokon belül (12 évesek: férfi / nő  $56,2 \pm 49,9$  /  $35,1 \pm 24,5$ ; 18-20 év közöttiek: férfi / nő  $27,5 \pm 18,9$  /  $32,1 \pm 23,8$ ; 30 év feletti:

férfi / nő  $63,9 \pm 66,6$  /  $55,6 \pm 39,9$ ;  $p > 0,05$ ). Kolmogorov-Smirnov teszt alapján normál eloszlás jellemző a csoportokra.



**19. ábra:** Nyugalmi nyálamiláz szintjének kvantitatív összehasonlítása különböző korcsoportok és nemek között. Jelmagyarázat: a fekete körök (●) atipikus értékeket képviselnek a nőknél a satírozott körök (◐) atipikus értékeket képviselnek a férfiaknál.

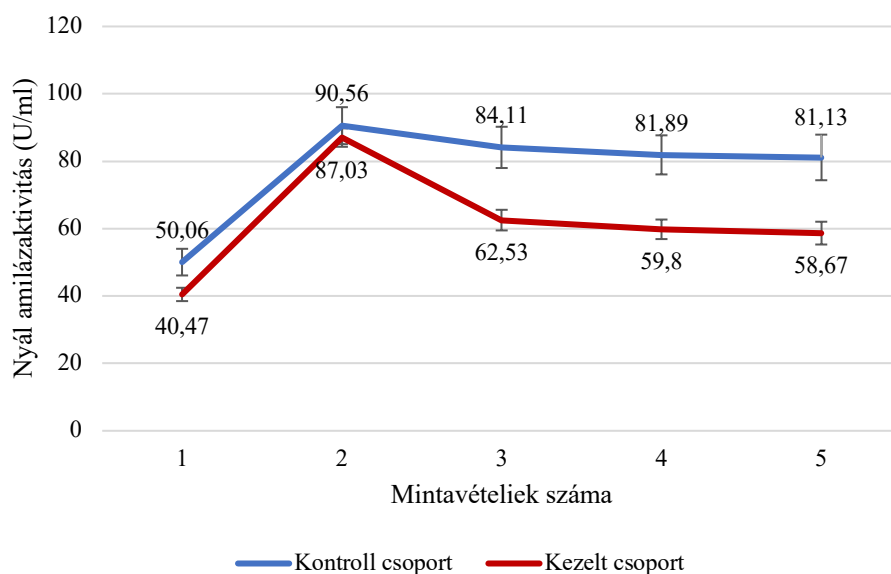
Mint ismeretes a nyál összetétele egyénenként változó lehet. Mérési eredményeink és a statisztikai elemzés során elmondható, hogy a nyál amilázaktivitásának variabilitása jelentősen magas volt. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a nyál összetétele jelentős egyéni különbséget mutat, mert a nyugalmi nyál amilázaktivitását számos rövid vagy hosszú távú tényező befolyásolhatja: nem, életkor, táplálkozás, étkezési szokások (dohány, kávé, alkohol, gyógyszerhasználat) szájjüreg egészségi állapot, testmozgás, szomatikus és pszichiátriai megbetegedések és az akut stressz (Rohleder és mts., 2009). Mérési eredményeink megerősítik azokat az irodalomban is leközölt eredményeket, hogy a nyugalmi nyál amilázaktivitást nem befolyásolja az életkor és a nem (Dawes, 1996; Rohleder és mts., 2009; Prodan és mts., 2015).

#### 5.4.3 A meggykivonatot tartalmazó rágógumi nyál amilázaktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata

Rohleder és mts., 2009-ben megjelent tanulmánya felhívja a figyelmet a mintavételi intervallum és a gyakoriság fontosságára. Az akut válaszok értékelésére szolgáló minták

gyakoriságára vonatkozóan minden 10. percet jelölik ki, melyet a beavatkozás befejezése után 20-30 percig kell venni. Alig van ilyen kísérletre példa. A meggykivonatot tartalmazó rágógumi hatását 30 percen át vizsgáltuk, és a kontroll csoport eredményeihez hasonlítottuk.

Mivel korábbi eredményeink igazolták, hogy a nem és az életkor nem befolyásolja a nyugalmi nyál amilázaktivitását. Az értékelés során a három korcsoporton belül, a férfiak és nők nyál amilázaktivitás értékeit átlagoltuk a kontroll és kezelt csoportban is. A kontroll és kezelt csoportok összetételével kapcsolatban szeretném megjegyezni, hogy összetételük hasonló volt kor és nem tekintetében. Eredményeinket a 20. ábrán mutatjuk be, ahol az 1: a nyugalmi nyálminta gyűjtés időpontja, mintavétel a rágógumi rágása előtt történt. 2: a rágógumi rágása után, azonnal megtörtént a mintavétel. A 3: a mintavétel 10 perccel a rágás után volt. A 4: 20 perccel a rágás után volt mintagyűjtés. 5: 30 perccel a stimuláció után történt a mintavétel.



**20. ábra:** A nyál amilázaktivitás szintje a kontroll (n = 34) és a kezelt (n = 36) csoportban a stimuláció előtt és után. Az adatokat, átlag  $\pm$  standard hiba (SE) formájában adjuk meg ( $p < 0,05$ ).

A kontroll és kezelt csoportok eredményeinek kiértékelése során látható, hogy az első mintavétel során vett nyálminták amilázaktivitása alacsony volt mindkét csoportban. Ennek az a magyarázata, hogy a nyugalmi nyálban az  $\alpha$ -amiláz enzim konformációjára a harmadlagos szerkezet jellemző, mely nem teszi lehetővé a szubsztrát kötődését.

A második (rágás utáni) mintavételnél látható, hogy az intenzív rágás hatására megnövekedett a nyál amilázaktivitás mindkét csoportban. Ennek az a magyarázata, hogy rágás hatására kialakult az inger nyál. Az inger nyál ionösszetétele jelentősen különbözik

a nyugalmi nyáltól. Az inger nyálban nő a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , és a  $\text{Cl}^-$  koncentrációja. Mint ismeretes az  $\alpha$ -amiláz egy allosztérikus enzim, amely azt jelenti, hogy egy allosztérikus aktivátornak kötődnie kell az enzimhez ahhoz, hogy az enzimre jellemző negyedleges szerkezete kialakuljon. Az enzim allosztérikus aktivátora a  $\text{Cl}^-$  ion. Tehát az intenzív rágás hatására, kialakult inger nyál, mely biztosította az enzim számára a megfelelő környezetet a konformáció változásra, és kialakult a nyálamilázra jellemző negyedleges szerkezet. Így a második mintavételi időpontban gyűjtött nyálmintákra jellemző amilázaktivitás szignifikánsan nő mindkét csoportban. Az egytényezős ismételt mérés ANOVA szignifikáns időhatást mutatott ( $p < 0,05$ ).

A harmadik mintavételnél az látható, hogy a rágás utáni 10 percen vett nyálminták amilázaktivitása a kezelt (meggykivonatot tartalmazó rágó) csoportban szignifikánsan csökkent, a kontroll csoporthoz képest. Ez azt jelenti, hogy a meggykivonatban lévő antocianinok bekötődtek az enzim aktív centrumába. A negyedik és ötödik mintavételi ponton gyűjtött nyálminták enzimaktivitásáról az mondható el, hogy a kezelt csoportnál tovább csökken az aktivitás, megközelíti a nyugalmi nyálra jellemző aktivitás értéket. Ebből következik, hogy az antocianinban dús meggykivonatot tartalmazó rágógumi rágása közben felszabaduló antocianinok a vizsgálati idő alatt, azaz harminc percen keresztül gátolták a keményítő bontását a szájüregben. Ezen eredményekkel igazoltuk, hogy az antocianinban dús meggykivonatnak jelentős szerepe lehet a fogszuvasodás prevenciójában, azaz a szájüregi egészség megőrzésében.

Az emelkedett nyál amilázaktivitás a stimuláció után a nyáltermelési folyamat részletes elemzésével magyarázható. A szájüregben előforduló nyálmirigyek a fültő- (szerózus nyálat termel, mely amilázban dús) az állkapocs alatti- (mucinózus nyálat termel) valamint a nyelv alatti mirigyek (viszkózus nyálat termel) eltérő arányban járulnak hozzá a nyáltermeléshez, a stimuláció hatására. A stimuláció alatt változik a nyálmirigyek nyáltermelésének százalékos aránya. Stimuláció hatására szervezetben termelődő nyálamiláz 80%-a a fültőmirigyekből, a 20%-a az állkapocs alatti mirigyekből származik (Aps és mts., 2015), ezért a stimulált nyálnak magas az nyálamiláz aktivitása.

A nem stimulált nyál 65-70%-ban származik az állkapocs alatti mirigyekből, míg a fültőmirigyek csak 20% -ban vesznek részt a nyál termelésbe (Humphrey és mts., 2001), ezért a nem stimulált nyálnak alacsony a nyálamiláz aktivitása. A stimuláció után, a fültőmirigyek szekréciója meghaladja a teljes nyálmirigy-szekréció több mint 50% -át (Edga, 1992; Rohleder és mts., 2009). Hasonló eredményekről számoltak be Arhakis és munkatársai 2013-ban megjelent tanulmányukban, ahol stimuláció hatására

szignifikánsan növekedett a nyál amilázaktivitása a 20-39 év közötti felnőtteknél (Arhakis és mts., 2013).

#### **5.4.4 Kérdőív értékelése I.**

A vizsgálatban résztvevők a betegtájékoztató elolvasása után, kitöltöttek egy kérdőívet is. A kérdőív kitöltésének célja az volt, hogy megnézzük, hogy az étkezési szokások (tejtermékek, gyakori édesség és a cukros, szénsavas üdítőital fogyasztása, rágógumi használata), továbbá az általános egészségügyi állapot (fogínyvérzés, allergia, szájszárazság, krónikus betegségek, stressz és a rendszeres gyógyszeresedés), valamint a fogápolási szokások (fogászati ellenőrzés gyakorisága, fogmosás, fogselyem és szájvíz) magyarázatot adhatnak-e a nyál amilázaktivitás változására. A betegtájékoztatót a 8. mellékletben, a kérdőívet a 9. mellékletben mutatjuk be.

A válaszadókat csoportokba soroltuk, aszerint, hogy az adott paraméter jellemző-e rájuk (1) vagy nem (0), majd megnéztük, hogy az így kapott csoportokra jellemző nyál amilázaktivitás szintek között van-e szignifikáns különbség. az eredmények az 4. táblázatban találhatók. Szignifikáns különbségnek tekintettük, ha  $p < 0,05$ . A paramétereket a nyugalmi nyálamiláz szintek  $p$  értékének megfelelően rendeztük, ahol a  $p$  értékek az egymintás t-próba eredményeit mutatják.

**4. táblázat:** A kérdőívre adott válaszok statisztikai értékelése az egyes paraméterek és kategóriák közötti átlagos nyugalmi nyál amilázaktivitás (sAA) szintek összehasonlítása.

| Paraméterek                     | Kategória | Egyedszám | Nyugalmi sAA (%) átlag $\pm$ SD | p<0,05 |
|---------------------------------|-----------|-----------|---------------------------------|--------|
| Rágógumi használat              | 0         | 47        | 51,32 $\pm$ 43,52               | 0,058  |
|                                 | 1         | 23        | 32,06 $\pm$ 27,99               |        |
| Fogíny vérzés                   | 0         | 44        | 39,35 $\pm$ 33,84               | 0,125  |
|                                 | 1         | 26        | 54,54 $\pm$ 47,78               |        |
| Krónikus betegség               | 0         | 62        | 40,10 $\pm$ 32,16               | 0,128  |
|                                 | 1         | 8         | 82,88 $\pm$ 69,74               |        |
| Fogselyem használat             | 0         | 39        | 38,94 $\pm$ 36,00               | 0,151  |
|                                 | 1         | 31        | 52,60 $\pm$ 43,82               |        |
| Allergia                        | 0         | 51        | 48,52 $\pm$ 44,38               | 0,228  |
|                                 | 1         | 19        | 35,51 $\pm$ 22,70               |        |
| Szájszárazság                   | 0         | 58        | 47,09 $\pm$ 41,89               | 0,336  |
|                                 | 1         | 12        | 34,82 $\pm$ 27,90               |        |
| Szájvíz használat               | 0         | 38        | 41,14 $\pm$ 36,29               | 0,383  |
|                                 | 1         | 32        | 49,56 $\pm$ 44,04               |        |
| Rendszeres fogorvosi ellenőrzés | 0         | 56        | 42,09 $\pm$ 32,94               | 0,403  |
|                                 | 1         | 14        | 56,59 $\pm$ 60,80               |        |
| DS kategória                    | DS=0      | 43        | 47,82 $\pm$ 39,73               | 0,458  |
|                                 | DS>0      | 27        | 40,48 $\pm$ 40,61               |        |
| Rendszeres gyógyszer használat  | 0         | 53        | 42,94 $\pm$ 33,55               | 0,564  |
|                                 | 1         | 17        | 51,39 $\pm$ 56,27               |        |

Kategória 0: nem jellemző az adott paraméter, kategória 1: jellemző az adott paraméter.

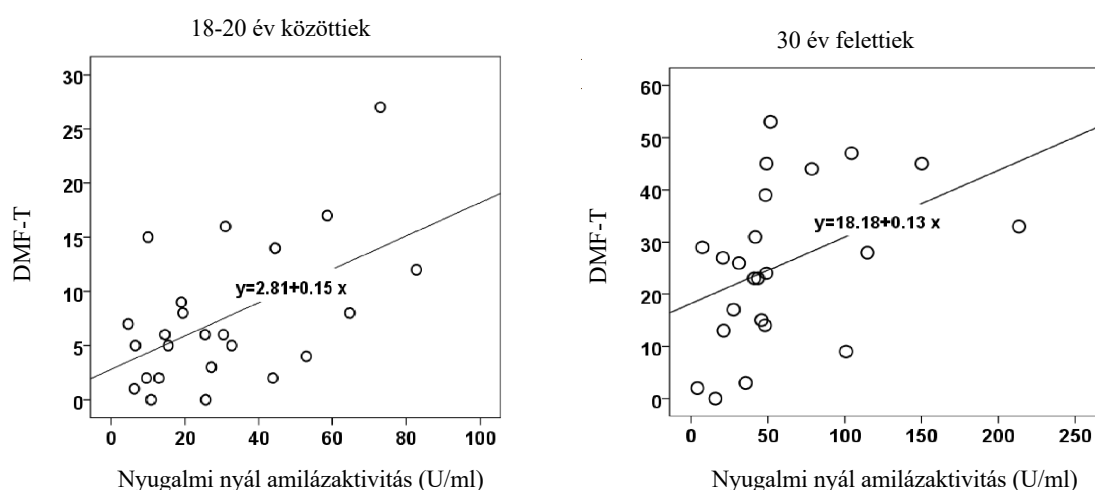
A fogíny vérzés gyakorisága és a fogselyem használata növelte a nyugalmi nyál amilázaktivitást, mely magyarázható a gyulladás hatásával.

Meglepő módon a rendszeres rágógumi használat csökkentette a nyugalmi nyál amilázaktivitás szintjét, bár a hatás nem volt szignifikáns. Ezen eredmény magyarázata, hogy a cukormentes rágógumi rágása az étkezések között segít megóvni a fogakat és az ínyt, a savas támadástól, mert a stimuláció hatására fokozódik a nyál elválasztás és nő a nyál pufferkapacitása is. A nyál amilázaktivitás szintjének csökkentése hosszú távú védelmet jelent a fogak számára. A rágógumi rágásának caries redukáló hatását tovább vizsgáltuk egy független két mintás t-próbával. Összehasonlítottuk a rágógumit rendszeresen használó és nem használók DMF-T értékeit. A rágógumit használó csoport DMF-T értékei szignifikánsan különböznek a rágógumit nem használó csoport DMF-T értékeitől (átlag  $\pm$  SD a rágógumit használó csoport: 7,6  $\pm$  7,8, és a rágógumit nem használó csoport: 14,2  $\pm$  15,4, p <0,05). Ebből következik, hogy a rágógumit használó csoportban lévő önkéntesek fogai egészségesebbek voltak, mely jól magyarázható a cukormentes rágógumi rendszeres használatából következő rövid és hosszú távú

védőhatások kombinációjával. A fogstátuszt a három kezelt csoportban is vizsgáltuk, Welch ANOVA teszttel ( $p < 0,05$ ). Games-Howell *post-hoc* tesztet alkalmaztunk a többszörös összehasonlításra. Nem meglepő, hogy a DMF-T értékek átlaga magasabb volt az idősebb korcsoportnál (átlag  $\pm$  SD a 12 évesek csoportjaiban  $2,8 \pm 3,8$ ; 18-20 év közöttiek csoportjaiban  $7,6 \pm 6,4$ ; 30 év felettiek csoportjaiban  $25,7 \pm 15,2$ ;  $p < 0,05$ ).

A Pearson korrelációs együttható ( $r$ ) alkalmazásával elemeztük a nyugalmi nyálban mért nyál amilázaktivitás értéket és a fogstátusz (DMF-T) közötti korrelációt. A felnőttek nyál amilázaktivitás értékei magasabbak voltak, azon önkéntesek esetében, akiknek több volt a szuvas foga, míg a gyermekeknél nem volt hatás (12 évesek  $r = -0,124$ ,  $p > 0,05$ ; 18-20 év közöttiek  $r = 0,546$ ,  $p < 0,05$ ; 30 év felettiek  $r = 0,415$ ,  $p < 0,05$ ).

A korreláció szignifikáns volt a felnőttek esetében, és pozitív lineáris összefüggést találtunk mindkét felnőtt korcsoportban (18-20 év közöttiek:  $y = 2,81 + 0,15x$ ,  $p < 0,05$ ; 30 év felettiek:  $y = 18,18 + 0,13x$ ,  $p < 0,05$ ). Az eredmények a 21. ábrán látható



**21. ábra** Nyugalmi nyál amilázaktivitás (sAA) és a DMF-T érték közötti regressziós vizsgálat a 18-20 év közöttiek és a 30 év felettiek korcsoportjában.

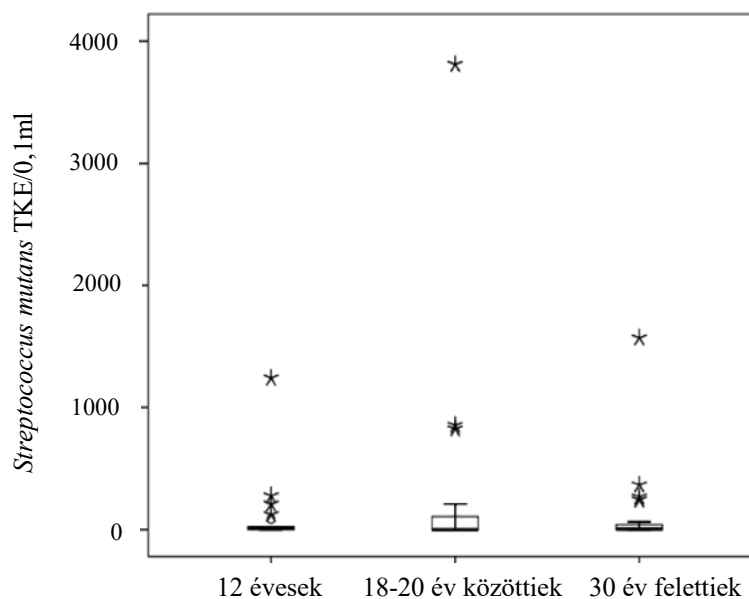
A lineáris regressziós görbék meredeksége megközelítőleg azonos volt, és azt mutatta, hogy az egységnyi nyál amilázaktivitás szint növekedése 0,15 vagy 0,13 értékkel növelheti a DMF-T értéket. Eredményeink azt mutatják, hogy a magasabb nyál amilázaktivitás szint magasabb DMF-T értéket eredményez a felnőtteknél. Ez összhangban áll más kutatók eredményeivel, (Ahmadi-Motamayel és mts., 2016; Singh és mts., 2015) melyek pozitív korrelációt mutattak a caries és a magas nyál amilázaktivitás között gyermekek és serdülőkorúak esetében.

#### 5.4.5 A meggykivonatot tartalmazó rágógumi hatásának vizsgálata *Streptococcus mutans* egyedszáma

Miller 1890-ben megjelent tanulmányában arról számolt be, hogy a fogszuvasodás kialakulásában kulcsfontosságú szerepet játszanak a szájüregben előforduló mikroorganizmusok. Természetesen ezt az elméletet ma már klinikai vizsgálatok egész sorozata igazolja, hogy mutans-streptococcusok jelenléte és a fogszuvasodás kialakulása között szoros összefüggés van. A cariogén baktériumok a táplálkozásból származó szénhidrátokból a bakteriális fermentációjuk során keletkező savas melléktermékek a fog kemény szövetének lokális pusztulásához vezetnek. Hevesi és mts., 2012-ben megjelent *in vitro* tanulmányában arról számol be, hogy a meggy gyümölcs az orális egészséget befolyásoló baktericid hatással rendelkezik. Eredményeik alapján a magyar meggyfajtákban az érés során fokozódó antocianin koncentráció korrelált a vizsgált fajták baktericid hatásával. A vizsgálatba bevont valamennyi résztvevő nyugalmi és inger nyálmintájában megvizsgáltuk a *S. mutans* jelenlétét és a telepek számát.

Vizsgálataink során  $10^4$  hígításokat készítettünk valamennyi nyálmintából. Az előkészített mitákból 100  $\mu$ l -t véres agaron szélesztettük, az inkubáció után a  $\beta$ -hemolízist megvizsgálva megszámtoltuk a telepeket.

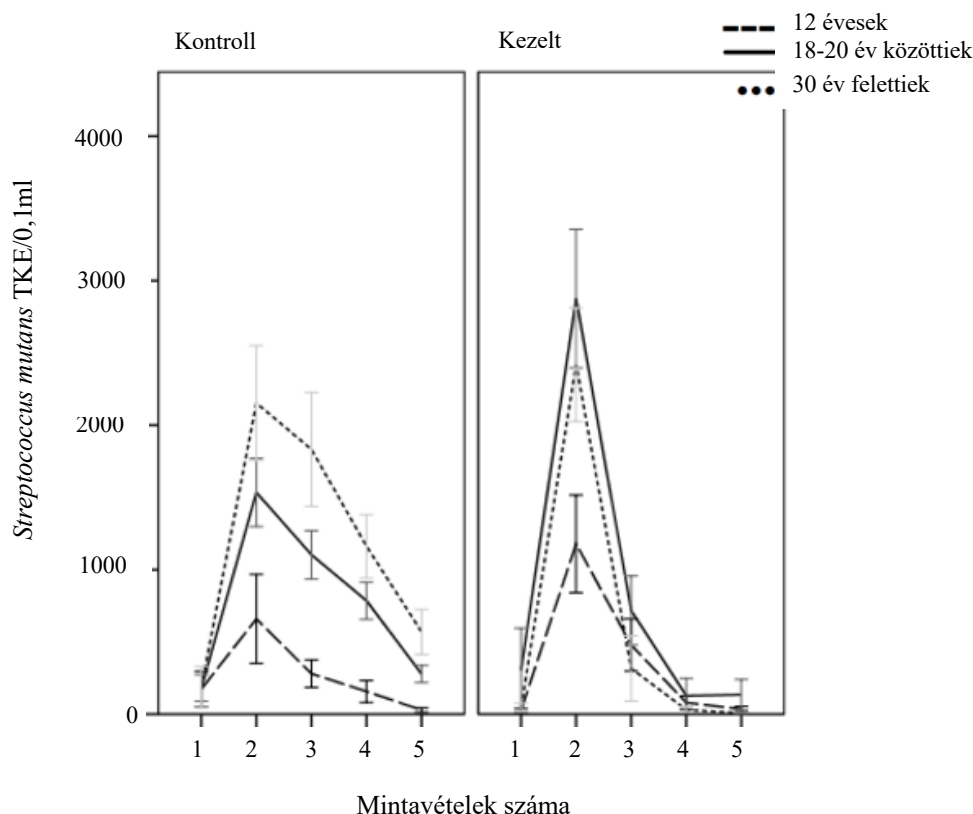
A nyugalmi nyálban mért *S. mutans* telepek számára vonatkozóan megállapítottuk, hogy szignifikánsan nincs különbség a három korcsoport között, és ezen értékeket nem befolyásolta a nem, az egyszempontú ANOVA alapján  $p > 0,05$ . A csoportokra a Kolmogorov-Smirnov teszt alapján normál eloszlás jellemző, az eredményeinket a 22. ábrán mutatjuk be.



**22. ábra:** A nyugalmi nyálban előforduló *S. mutans* telepszámának változása a különböző korcsoportok között.  
Jelmagyarázat: a csillagok (\*) a szélső értékeket jelölik.

Bár minden korcsoportban volt néhány, rendkívül magas *S. mutans* telepszámú páciens, de általában igaz az, hogy a nyugalmi nyálban a *S. mutans* szintje alacsony volt, ami tükrözi azt a tényt, hogy a *S. mutans* adhézióra képes mikroorganizmus, inkább a biofilmben fordul elő szesszilis formában, mint planktonikus formában a szájüregben (Wessel és mts., 2014).

Megvizsgáltuk a 12 évesek, 18-20 év közöttiek és a 30 év feletti korcsoport, kontroll és kezelt alanyoktól származó nyálminták *S. mutans* telepszámokat. Az egytényezős ismételt méréses ANOVA szignifikáns időhatást mutatott. Mérési eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a 2. azaz közvetlenül a rágógumi rágása után gyűjtött nyálmintáknak a *S. mutans* telepszáma, szignifikánsan különbözött a kontroll és kezelt csoportokban, valamennyi korcsoportnál. Az eredményeket a 23. ábrán mutatjuk be.



**23. ábra:** A három korcsoport *S. mutans* szám változása, a kontroll (n = 34) és kezelt (n = 36) csoportokban. Az adatokat átlag ± standard hiba (SE) formájába adjuk meg.

A kontroll és a kezelt csoportoknál hasonlóan alacsony kezdeti *S. mutans* szint látható a rágás előtti, nyugalmi nyálmintákban (1.). Ennek az az oka, hogy a baktériumok a biofilmhez kötött, azaz sessilis módon fordulnak elő. Így a nyugalmi nyálminták *S. mutans* szintje rendkívül alacsony a kontroll és a kezelt csoportoknál egyaránt.

Közvetlenül a rágás utáni (2.) mintavételnél az látható, hogy a *S. mutans* egyedszám a kontroll és a kezelt csoportoknál egyaránt nő. A hatás szignifikáns a kezelt csoport valamennyi korcsoportjánál szemben a kontrollal. Ennek az a magyarázata, hogy az intenzív rágás hatására a biofilm egysége megbomlik és nagy mennyiségű *S. mutans* kerül a szájüregbe. A harmadik mintavételből származó nyálminták *S. mutans* szintje jelentősen csökken a kezelt csoport valamennyi korcsoportjánál, szemben a kontroll csoporttal. Ez azzal magyarázható, hogy a meggykivonatban lévő antocianinok gátolják a *S. mutans* kötődését a biofilmhez. Az intenzív rágás következtében nagy mennyiségben termelődik a nyál, mely a folyamatos nyelésnek köszönhetően az adhézióra nem képes mikroorganizmusok kiürülését segíti a szájüregből szemben a kontroll csoporttal.

A negyedik és ötödik mintavételnél az látható, hogy a meggykivonatot tartalmazó rágógumit használóknál a *S. mutans* telepszám megközelíti a nyugalmi nyál *S. mutans*

szintjét valamennyi korcsoportban szemben a kontroll csoporttal. Ebből arra lehet következtetni, hogy az antocianinban dús meggykivonatot tartalmazó rágógumi rágása közben felszabaduló antocianinok, a vizsgálati idő alatt, azaz 30 percig folyamatosan gátolt volt a *S. mutans* baktériumok adhézioja a biofilmhez. A folyamatos rágás következménye, hogy a keletkező nagymennyiségű nyál hatására a szájüregből ezen mikroorganizmus ki is ürült.

Ezen eredményekkel igazoltuk, hogy az antocianinban dús meggykivonatnak jelentős szerepe lehet a fogszuvasodás prevenciójában, azaz a szájüregi egészség megőrzésében.

#### 5.4.6 Kérdőív értékelése II.

A válaszadókat csoportokba soroltuk, aszerint, hogy az adott paraméter jellemző-e rájuk (1) vagy nem (0), majd megnéztük, hogy az így kapott csoportokra jellemző nyál amilázaktivitás szintek között van-e szignifikáns különbség. az eredmények az 5. táblázatban találhatók. Szignifikáns különbségnek tekintettük, ha  $p < 0,05$ . A paramétereket a nyugalmi nyálamiláz szintek  $p$  értékének megfelelően rendeztük, ahol a  $p$  értékek az egymintás  $t$ -próba eredményeit mutatják.

A kérdőív kiértékelése során a nyugalmi nyál *S. mutans* szintjére az jellemző, hogy szignifikáns hatás csak az allergiások esetében volt kimutatható. Az allergiásokra jellemző, hogy gyógyszert szednek a tüneteik csökkentése érdekében ezért általánosságban jellemző rájuk a szájszárazság. Mint ismeretes a nyál fontos szerepet játszik a caries keletkezésében és gátlásában is. A megfelelő nyálszekréció során keletkező nyál tisztítja a szájüreget a mikroorganizmusoktól. A csökkent nyálszekréció esetén, ami szájszárazságot okoz, a fokozott mucin tartalom megnöveli a viszkozitást, de a fogmosás és fogápolás hatására a planktonikus baktériumok mennyisége csökkenhet. A rágógumi és a fogselyem használat jelentősen növeli a *S. mutans* számot a nyugalmi nyálmintákban.

Ennek az lehet a magyarázata, hogy a rendszeres fogselyem és a rágógumi használata biztosítja az erős mechanikai tisztítást, mely nem teszi lehetővé az érett biofilm kialakulását, továbbá a baktériumok inkább planktonikus formában vannak jelen a szájüregben.

**5. táblázat:** A kérdőívekre adott válaszok statisztikai értékelése az egyes paraméterek és kategóriák közötti átlagos nyugalmi nyál *S. mutans* telepszám (TKE/0,1 ml) összehasonlítása.

| Paraméterek                     | Kategória | Egyedszám | Nyugalmi nyál <i>S. mutans</i> TKE/0,1 ml<br>±SD | p<0,05 |
|---------------------------------|-----------|-----------|--------------------------------------------------|--------|
| Rágógumi használat              | 0         | 47        | 88,68±261,39                                     | 0,265  |
|                                 | 1         | 23        | 290,09±826,32                                    |        |
| Fogíny vérzés                   | 0         | 44        | 200,59±641,30                                    | 0,344  |
|                                 | 1         | 26        | 77,46±185,31                                     |        |
| Krónikus betegség               | 0         | 62        | 144,94±522,23                                    | 0,661  |
|                                 | 1         | 8         | 231,75±547,87                                    |        |
| Fogselyem használat             | 0         | 39        | 73,59±153,61                                     | 0,195  |
|                                 | 1         | 31        | 527,10±759,66                                    |        |
| Allergia                        | 0         | 51        | 202,78±604,69                                    | 0,045  |
|                                 | 1         | 19        | 26,21±65,44                                      |        |
| Szájszárazság                   | 0         | 58        | 183,88±569,65                                    | 0,310  |
|                                 | 1         | 12        | 14,58±29,76                                      |        |
| Szájvíz használat               | 0         | 38        | 135,24±339,45                                    | 0,734  |
|                                 | 1         | 32        | 178,16±683,81                                    |        |
| Rendszeres fogorvosi ellenőrzés | 0         | 56        | 160,18±547,75                                    | 0,866  |
|                                 | 1         | 14        | 133,57±418,90                                    |        |
| DS kategória                    | DS=0      | 43        | 176,91±613,20                                    | 0,659  |
|                                 | DS>0      | 27        | 119,74±336,50                                    |        |
| Rendszeres gyógyszer használat  | 0         | 53        | 168,91±562,04                                    | 0,694  |
|                                 | 1         | 17        | 111,06±380,93                                    |        |

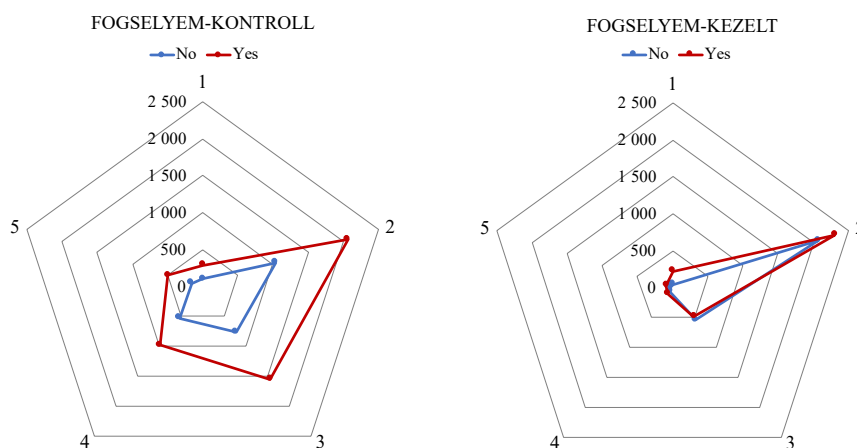
Kategória 0: nem jellemző az adott paraméter, kategória 1: jellemző az adott paraméter.

Az egyszempontú ismételt méréses ANOVA alapján, három esetben (fogselyem használat, fogstátusz, szájszárazság) szignifikáns különbség van a kontroll és a kezelt csoportok között melyet a 24-26. ábrán mutatunk be.

A kontroll csoportban a rendszeres fogselyem használók *S. mutans* szintje szignifikánsan magasabb volt, minden mintavételi időpontban, szemben azokkal, akik nem használnak fogselymet. Ennek magyarázata az lehet, hogy a biofilm kevésbé volt stabil azon alanyoknál, akik rendszeresen használnak fogselymet a plakk eltávolítására. A gyakori fogselyem használat az intenzív mechanikus tisztítás része, mely megakadályozza a halványsárga, krémszerű dentális plakk kialakulását. Azoknál az alanyoknál, akik rendszeres használnak fogselymet a fogakon és a fogak közti résekben nem alakul ki a dentális plakk, azaz a *S. mutans* inkább planktonikus formában van jelen. Ezzel szemben a fogselymet nem használóknál a dentális plakk a tisztítás szempontjából nehezen hozzáférhető területeken megjelenik, így a mikrobaközösség szesszilis módon fordul elő. Ezért a fogselymet nem használóknál azt váránk, hogy a *S. mutans* szintje

nagyon alacsony lesz mert stabil biofilmmel rendelkeztek. De a rágógumi rágása szintén erős mechanikus, rágó, szivattyúzó mozgást fejt ki, melynek hatására a *S. mutans* egyrésze kiszabadul a biofilmből, bár a hatás nem olyan jelentős mint rendszeres fogszelvény használóknál a kontroll csoportban.

A kezelt csoportnál, akik meggykivonatot tartalmazó rágógumit rágtek, a rágás után 20 perccel a *S. mutans* szám szignifikánsan csökkent, akár használtak rendszeresen fogszelvényt, akár nem. Ennek a magyarázata az lehet, hogy a rágógumi használat során kialakuló rágó és szivattyúzó mozgás következtében a stabil biofilm megváltozik, melyet a rágóban lévő meggykivonat tovább erősített, ami a *S. mutans* telepszámának szignifikáns csökkenésében nyilvánult meg. Az eredmény a 24. ábrán látható.

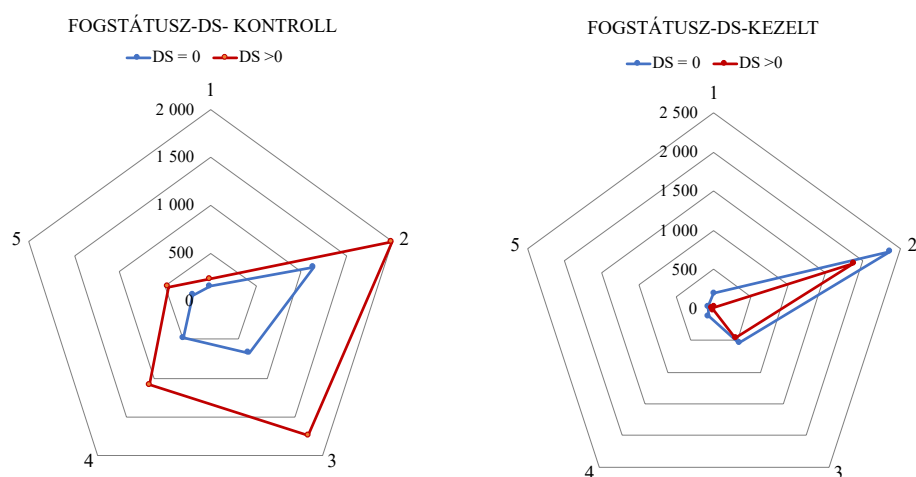


**24. ábra:** *S. mutans* telepszámának változása a fogszelvény használat függvényében a kontroll ( $n = 34$ ) és kezelt ( $n = 36$ ) csoportoknál.

Jelmagyarázat: az ötszög csúcsainál feltüntetett számok, a mintavételek számát jelölik, kék színnel jelöltük azokat, akik nem használnak fogszelvényt; piros színnel jelöltük azokat, akik használnak fogszelvényt.

Hasonló hatást tapasztaltunk a DS (bomló fogfelület) kategória elemzése során is. A kontroll csoporton belül, a szuvasfoggal rendelkezők ( $DS > 0$ ) mintáinak vizsgálata során a stimulált nyálmintában, de különösen a rágás után, valamint a rágást követő 10. és 20. percben a *S. mutans* száma nagyobb volt. Szemben a szuvas foggal nem rendelkezőknél ugyan ezen mintavételi pontokban. Ennek oka, hogy a *S. mutans* szám a szájüregben, szoros összefüggésben van a bomló fogfelületek számával. Ugyanis a tartósan szuvas fogakra jellemző, hogy a fogüregben megjelennek a cariogén hatású baktériumok köztük a *S. mutans* és *Lactobacillus* fajok. Viszont, ha a fogak helyreállítása megtörténik, akkor a szájüregben az alacsony patogenitású fajok jelennek meg. Ez az oka, hogy a szuvas foggal nem rendelkezőknél ( $DS = 0$ ) kisebb a *S. mutans* szám.

Amikor megvizsgáltuk a kezelt csoportot (akik meggykivonatot tartalmazó rágót rágta), mindkét esetben, a szuvasfoggal rendelkezőkre (DS>0) és a szuvasfoggal nem rendelkezőkre (DS=0) egyaránt jellemző, hogy rágás utáni nyálmintákban megnövekedett a *S. mutans* szám, szemben a rágás utáni 10. és 20. percből származó nyálmintáknál, ahol rendkívül alacsony volt a baktériumszám. A kezelt csoporton (DS>0 és DS=0) belül a különbségek teljesen eltűntek. Ezen hatás oka a meggykivonatban keresendő. In vitro kísérletekkel korábban igazolták, hogy a meggy gyümölcs a szájüregi egészséget befolyásoló baktericid hatással rendelkezik (Hevesi és mts., 2012). A különbség szignifikánsan magasabb volt a stimulált nyálban. Az eredményeket a 25. ábra mutatja be.

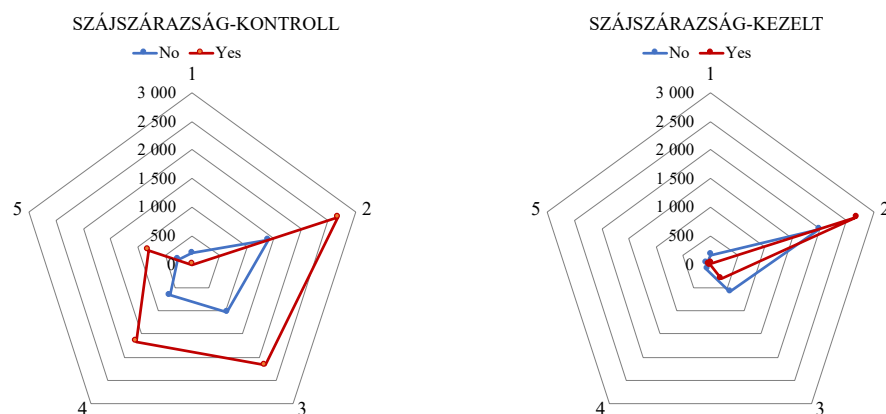


**25. ábra:** *S. mutans* telepszámának változása a fogstátusz függvényében a kontroll (n = 34) és kezelt (n = 36) csoportoknál.

Jelmagyarázat: az ötszög csúcsainál feltüntetett számok, a mintevételek számát jelölik, kék színnel jelölt DS=0, akiknek nincs szuvas foga; piros színnel jelölt DS>0, akiknek van szuvas foga.

Hasonló hatást tapasztaltunk a szájszárazság kategória elemzése során is. A kontroll csoportnál az látható azok az alanyok, akik szájszárazságra panaszkodtak, valamennyi mintavételi időpontból származó nyálminták *S. mutans* szintje magasabb volt, szemben azokkal, akik nem tapasztalták ezt a tünetet.

A szájszárazságban szenvedőknél kontroll és kezelt csoportoknál egyaránt magas volt a rágás utáni *S. mutans* szám, szemben azokkal, akik nem szenvednek szájszárazságban. Ez azzal magyarázható, hogy a csökkent nyáltermelés hatására a pangó bomlás termékek jó táptalajt biztosítanak a baktériumoknak.



**26. ábra:** *S. mutans* számának változása a szájszárazság függvényében a kontroll (n = 34) és kezelt (n = 36) csoportoknál.

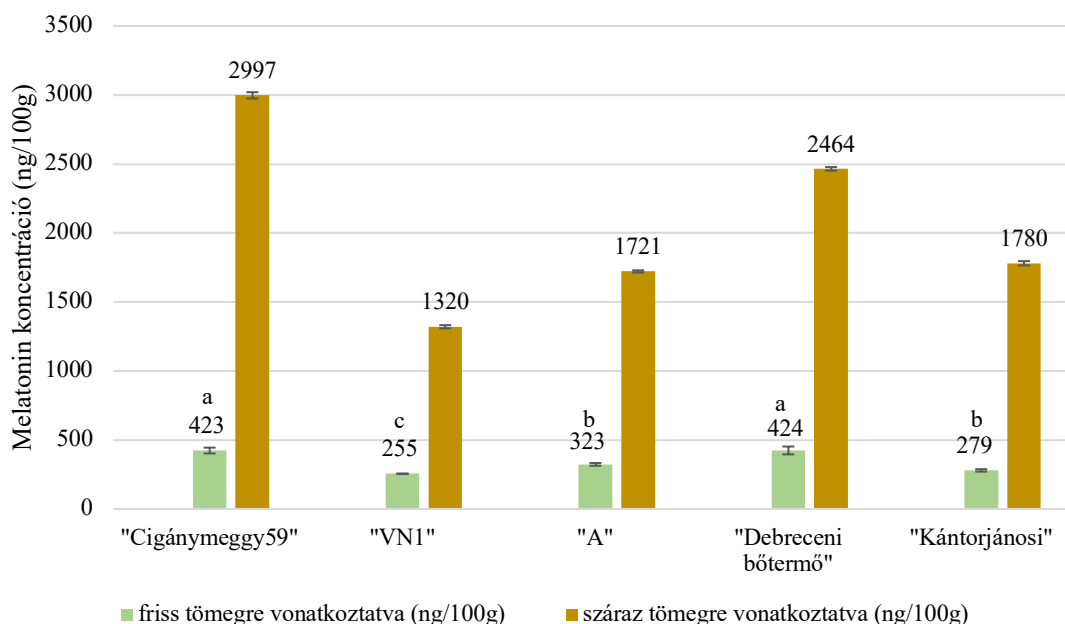
Jelmagyarázat: az ötszög csúcsainál feltüntetett számok, a mintavételek számát jelölik, kék színnel jelöltük azokat, akiknek nincs szájszárazsága; piros színnel jelöltük azokat, akiknek van szájszárazsága.

A kezelt csoportnál azt láthatjuk, hogy a 20 perc után a kategóriák közötti különbségek teljesen eltűntek. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a meggykivonatban lévő antocianinok gátolják a *S. mutans* kötődését a biofilmhez. Az intenzív rágás hatása a nagymennyiségű nyál keletkezése mely a folyamatos nyelés hatására kiürül a szájüregből.

## 5.5 A MEGGY MELATONIN KONCENTRÁCIÓJÁNAK MEGHATÁROZÁSA

Vizsgáltunk egy másik biológiailag aktív vegyület a melatonin koncentrációját a 'Cigánymeggy 59' a 'VN1', 'Debreceni bőtermő', 'Kántorjánosi', valamint az 'A' meggyfajtákban. Korábbi tanulmányokból ismert, hogy a melatonin dózisfüggő módon csökkenti a már kialakult biofilm életképességét, továbbá gátolja a biofilm képződését. A biofilm képződésének gátlása nagymértékben hozzájárulhat a bakteriális növekedés csökkenéséhez (Zhou és mts. 2016).

Az általunk vizsgált öt magyarországi meggyfajta melatonin koncentrációját nagynyomású folyadék kromatográfiás technikával határoztuk meg. A melatonin koncentráció meghatározásához szükséges volt a melatonin kalibrációs görbéjének felvételére, amely lehetővé teszi a melatonin kvalitatív és kvantitatív meghatározását. A melatonin koncentráció függvényében ábrázoltuk a csúcs alatti területeket és egyenest illesztettünk a kapott pontokra. A kalibrációt a 7. mellékletben mutatjuk be. Az egyenes egyenletéből kiszámoltuk a mintákban azonosított melatonin csúcs koncentrációját. A mintákhoz tartozó kromatogramok a 8. mellékletben láthatóak.



**27. ábra:** A vizsgált meggyfajták melatonin koncentrációjának meghatározása HPLC módszerrel. A friss tömeg vonatkoztatott koncentrációk alapján: „b”-vel jelölt fajták között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ( $p < 0,05$ ) egyszempontú ANOVA alapján. Az adatokat, átlag  $\pm$  szórás (SD) formájában adjuk meg.

Valamennyi vizsgált meggymintában jelentős mennyiségű melatonin volt kimutatható. Mérési eredményeinket a 27. ábra foglalja össze. A 'Cigánymeggy 59' és a 'Debreceni bőtermő' fajtáknak volt a legmagasabb a melatonin koncentrációja (423 ng/100g; 424 ng/100g friss tömegre vonatkoztatva), majd ezt követi a 'Kántorjánosi' és az 'A' fajta melyek közel azonos melatonin koncentrációval jellemezhetők (279 ng/100g; 323 ng/100g friss tömegre vonatkoztatva). Eredményeink szerint a 'Bosnyák' tájfajtakörhöz tartozó 'VN1' fajta kisebb koncentrációban tartalmaz melatonint (255 ng/100g), mint a korábban felsoroltak.

A 'Cigánymeggy 59' és a 'Debreceni bőtermő' fajták friss tömegre vonatkoztatott melatonin koncentrációja szignifikánsan nagyobbak a 'VN1', 'A' és 'Kántorjánosi' fajtákhoz viszonyítva. Továbbá az is látható, hogy a 'VN1' fajta friss tömegre vonatkoztatott melatonin koncentrációja szignifikánsan különbözik 'Cigánymeggy 59' és a 'Kántorjánosi' tájfajtakörhöz tartozó fajtáktól. Viszont a 'Debreceni bőtermő' és a 'Kántorjánosi' fajták friss tömegre vonatkoztatott melatonin koncentrációi szignifikánsan nem különböznek egymástól ( $p < 0,05$ ).

A meggy extraktumokat tovább tisztítottuk preparatív HPLC-s technikával, és MALDI-TOF MS elemzéssel azonosítottunk m/z érték alapján: a melatonin 232,29 Da. A MALDI-TOF MS spektrum a 9. mellékletben látható.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Kutatásaink során a magyarországi meggyfajtákban felhalmozódó antocianinok hatását tanulmányoztuk a fogszuvasodás kialakulásának prevenciójában.

Az álatunk alkalmazott hordozóanyagban a meggykivonatban található biológiailag aktív antocianinok a termék készítése közben megőrizték, valamint a kísérlet során kifejtették hatásukat. A kinetikai vizsgálatok során bizonyítottuk, hogy a meggykivonatot tartalmazó rágógumi rágása során kioldódó antocianinok gátolták a humán nyál amilázaktivitást a kontroll csoporthoz képest. A mikrobiológiai vizsgálati eredmények alátámasztották azt a feltételezésünket, hogy a meggykivonatot tartalmazó rágógumi rágása során felszabaduló antocianinok hatására a biofilmbe beágyazott *Streptococcus mutans* szám hirtelen megnövekedik, azaz kiszabadulnak a mikroorganizmusok, majd a következő vizsgálati szakaszban a *S. mutans* szám, drasztikusan csökken a kontroll csoporthoz képest. Eredményeink igazolják, hogy a 'VN1' meggyfajtákból készült antocianinban dús meggykivonatot tartalmazó rágóguminak jelentős szerepe lehet a fogszuvasodás prevenciójában. Az általunk választott magyarországi meggyfajtákra vonatkozó vizsgálatokat kiegészítettük egy másik biológiailag aktív vegyület, a melatonin koncentráció meghatározásával, mert ismeretes, hogy a melatonin képes csökkenteni a kialakult biofilm életképességét, valamint gátolja a biofilm képződést (Zhou és mts. 2016).

Mérési eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a magyarországi meggyfajták kiemelkedően magas melatonin koncentrációval rendelkeznek.

További vizsgálatok szükségesek annak megértésére, hogy az antocianinok és a melatonin, milyen mechanizmuson keresztül vehetnek részt a biofilm kialakulásának gátlásában. Szeretnénk a jövőben tanulmányozni a meggyben lévő cianidinfélék és a melatonin hatását a biofilm növekedésre. A jövőben további *in vitro* vizsgálatok szükségesek arra vonatkozóan, hogy a magyarországi meggyfajtákból izolált cianidin komponensek milyen hatással vannak a glükózil-transzferáz (GTF) aktivitásra.

Továbbá szeretnénk megvizsgálni ezen meggykivonatok hatását *in vitro*, *in vivo* biofilmen. Ezen vizsgálatokkal igazolhatjuk, hogy a magyarországi meggyfajtákból származó antocianinok képesek gátolni a *Streptococcus mutans* által termelt glükózil-transzferázok aktivitását és ezáltal a biofilm képződését, továbbá gátolják a *S. mutans* szaporodását is.

## 7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Mérési módszert dolgoztunk ki a meggy antocianinok és a meggykivonat, *in vitro* kinetikai vizsgálatára humán nyálamilázon.
2. *In vitro* tanulmányban igazoltuk, hogy a magyarországi meggyfajtákból készített meggykivonatok és az egyes antocianin komponensek  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban tisztán kompetitív módon képesek gátolni a humán nyál amilázaktivitását. A tiszta antocianin struktúrák gátlás hatékonyságának jellemzésére meghatároztuk az  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) értéket: cianidin-3-glükózid:  $180 \pm 20$ , cianidin-3-rutinozid:  $200 \pm 24$ , malvidin-3-glükózid:  $675 \pm 73$ , malvidin-3,5-diglükózid:  $80 \pm 10$ . Az egyes meggy extraktumok gátlás hatékonyságának jellemzésére megállapítottuk az  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) értéket: 'Cigánymeggy 59':  $330 \pm 45$ , 'VN1':  $610 \pm 50$ , 'A':  $790 \pm 55$ , 'Debreceni bőtermő':  $370 \pm 42$ , 'Kántorjánosi':  $892 \pm 62$ .
3. Eljárást dolgoztunk ki, olyan antocianinban dús meggykivonat előállítására, melyben a biológiailag aktív molekulák megőrzik hatásukat.
4. Méréseinkkel bizonyítottuk, hogy a meggykivonatot tartalmazó rágógumi fejlesztése során, az antocianinban dús meggykivonat nem veszítette el biológiai aktivitását.
5. Pilot clinical study-ban igazoltuk, hogy a 'VN1' fajtából készült meggykivonatot tartalmazó rágógumi, melynek antocianin tartalma  $11,87 \text{ mg}/100\text{mg}$ , hatásos a fogszuvasodás prevenciójában, melyet a humán nyál amilázaktivitás gátlásával, valamint a *Streptococcus mutans* egyedszámának csökkenésével igazoltunk.

A kontroll és a kezelt csoportban a rágás hatására a nyál amilázaktivitás  $90,56$  és  $87,03 \text{ U/ml}$ -re növekedett. A kezelt csoportban az antocianin hatására  $58,67 \text{ U/ml}$ -re csökken a nyál amilázaktivitás értéke, 30 perces vizsgálati idő alatt, megközelítve a nyugalmi nyál amilázaktivitást, melynek értéke  $50,06$  és  $40,47 \text{ U/ml}$  volt. Az antocianinok kötődnek a nyálamiláz enzim aktív centrumához, gátolva ezzel a keményítő bontást a szájüregben. A kontroll és a kezelt csoportban valamennyi korcsoportnál a rágás hatására nagy mennyiségű *Streptococcus mutans* jelent meg a nyálmintákban, melynek értéke  $2875\text{--}943 \text{ TKE}/0,1\text{ml}$  volt. A kezelt csoportban a 30 perces vizsgálati idő alatt átlagosan  $35 \text{ TKE}/0,1\text{ml}$ -re csökken a *Streptococcus mutans* szám a nyálban, valamennyi korcsoport esetében. Az antocianinok gátolják a *Streptococcus mutans* baktériumok adhézióját a biofilmhez.

## 8. GYAKORLATBAN ALAKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK

- Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az antocianinban dús 'VN1' meggyfajta, megfelelő extrakciós technológia alkalmazásával meghatározó szerepet tölthet be a fogszuvasodás prevenciójában.

Az antocianinok kötődnek a nyálamiláz enzim aktív centrumához, gátolva ezzel a keményítő bontást a szájüregben. A kezelt csoportban a rágás hatására a nyál amilázaktivitás 87,03 U/ml-re növekedett. Az antocianinok hatására, a kezelt csoportban 58,67 U/ml-re csökken a nyál amilázaktivitás értéke, 30 perces vizsgálati idő alatt, megközelítve a nyugalmi nyál amilázaktivitás értékét. Az antocianinok gátolják a *Streptococcus mutans* baktériumok adhézióját a biofilmhez, a kezelt csoportban a 30 perces vizsgálati idő alatt a kezdeti 2876-1178 TKE/0,1ml *Streptococcus mutans* szám, átlagosan 35 TKE/0,1ml-re csökken a nyálban, valamennyi korcsoport esetében.

- A kísérleteinkhez választott hordozóanyag, az olvasztásos technikával készült rágógumi képes megőrizni a meggykivonatban lévő antocianinok biológiai hatását. A rágógumi antocianin tartalma 45%-ban oldódott ki 15 perces vizsgálati idő alatt. Vizsgálati eredményeinkkel igazoltuk, hogy a rágógumi alkalmas más a természetben előforduló inhibitor vegyületek hordozójának. Ráadásul a rágógumi nagyon népszerű élelmiszeripari termék, melyre jellemző, hogy a társadalom által széles körben elfogadott, tulajdonképpen annak rutinszerű alkalmazásáról beszélünk. A szájüreg- és fogápolási eszközök rendszeres használata mellett, a 0,1 g 'VN1' meggykivonatot tartalmazó rágógumi, melynek antocianin tartalma 11,87 mg/100mg egy olyan prototípus, amely könnyű és gyors használattal jelentős szerepet tölthet be a fogszuvasodás megelőzésében, hisz mindenki ismer olyan körülményeket (iskola, munkahely, hosszan tartó utazás) amikor az étkezések utáni fogmosás nem lehetséges.
- Ezen kívül egyéb fejlesztésekkel megoldható, hogy más, a szájápolásból már jól ismert termék (fogkrém, szájvíz, fogselyem) szintén előállítható meggykivonat felhasználásával.

## 9. ÖSSZEFOGLALÁS

*A meggykivonat vizsgálatával kapcsolatos eredmények:*

Megvizsgáltuk az egyes meggyfajták szárazanyag-tartalmát és megállapítottuk, hogy a 'VN1' fajtának a legmagasabb 19,32% míg 'Cigánymeggy 59' rendelkezik a legalacsonyabb szárazanyag-tartalommal melynek értéke 14,12% volt.

Ezt követően meghatároztuk ezen meggyfajtákra jellemző összes antocianin koncentrációt, pH-differenciális módszer és szilárd fázisú extrakcióval (SPE) történő izolálással. Mérési eredményeink alapján elmondható, hogy a 'Cigánymeggy 59' fajtának szignifikánsan nagyobb volt az antocianin koncentrációja ( $p < 0,05$ ).

A meggyfajták antocianin profilját UHPLC-vel határoztuk meg, alkalmazható kromatográfiás eljárást dolgoztunk ki az egyes antocianin komponensek kvalitatív és kvantitatív meghatározására. Az általunk tanulmányozott valamennyi fajtának a cianidin-3-rutinozid koncentrációja volt a legnagyobb. A 'VN1' fajtának szignifikánsan nagyobb volt az antocianin koncentrációja ( $p < 0,05$ ). A meggy fő komponenseinek azonosítása MALDI-TOF tömegspektrométerrel valósult meg, mellyel sikerült igazolni, hogy a csúcsok egy anyagot tartalmaznak, azaz más hasonló kromatográfiás tulajdonságokkal rendelkező molekulák nem találhatók az egyes csúcsokban. Három fő komponenst azonosítottunk  $m/z$  értékük alapján: cianidin-3-glükózil-rutinozid 757,5 Da, cianidin-3-glükózidot 449,1 Da, cianidin 3-rutinozidot 595,6 Da. Ezen kívül számos kisebb antocianin összetevőt is azonosítottunk a meggykivonatok HPLC-frakciókból.

Ezek után megvizsgáltuk az egyes antocianin standardok antioxidáns kapacitását is. A vizsgált antocianin standardok zsíroldékony antioxidáns kapacitás eredményeinkről elmondható, hogy az eltérés egymáshoz képest nem volt szignifikáns ( $p < 0,05$ ). A standardok vízőldékony antioxidáns kapacitása minden esetben sokkal alacsonyabb volt, mint a zsíroldékony antioxidáns kapacitása, ebből arra következtettünk, hogy az antocianin standardok jobban oldódnak alkoholba, mint vízben. Megvizsgáltuk az öt magyarországi meggyfajta zsír- és vízőldékony antioxidáns kapacitását fotokemilumineszcens módszerrel. A vizsgált fajták közül kiemelkedően magas víz- (ACW) és zsíroldékony antioxidáns kapacitás (ACL) jellemző a 'VN1' fajtára.

### *Antocianinok és meggykivonat hatásának a humán nyál amilázaktivitásra:*

Tanulmányoztuk a meggykivonatok és egyes antocianinok gátló aktivitását humán nyálamiláz (EC 3.2.1.1) jelenlétében GalG<sub>2</sub>-CNP szubsztráton.

Elsőként igazoltuk, hogy a meggykivonatok és az egyes antocianinok  $\mu\text{M}$  koncentrációban képesek gátolni a humán nyál amilázaktivitást. Meghatároztuk a gátlás típusát, melyre jellemző, hogy tisztán kompetitív módon gátol. Az egyes meggy extraktumok, illetve tiszta antocianin struktúrák jellemzésére meghatároztuk az IC<sub>50</sub> értéket. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a legnagyobb inhibíciós aktivitással a malvidin-3,5-diglükózid rendelkezik. Ezt követi a cianidin-3-glükózid, cianidin-3-rutinozid és végül a malvidin-3-glükózidnak volt a legkisebb az inhibíciós aktivitása. Hasonlóképpen megvizsgáltuk az egyes meggykivonatok IC<sub>50</sub> értékét. A 'Cigánymeggy 59' és a 'Debreceni bőtermő' jobb inhibitorok, mint a vizsgálatban szereplő egyéb meggykivonatok. A 'Cigánymeggy 59' jó inhibitor tulajdonsága korrelál a magas antocianin tartalmával, míg a 'Debreceni bőtermő' fajtánál jobb gátlási aktivitást mértünk, mint ahogy azt antocianin tartalmából számoltuk, ami más olyan vegyületek jelenlétére utal, amelyek gátló hatással rendelkeznek.

*In silico* modellezték az általunk tanulmányozott antocianin struktúrák HSA aktív centrumához való kötődését.

Mint ismeretes a humán nyálamiláz enzim -1, -2, -3 alhelyeinek betöltöttsége központi szerepet játszik a katalitikus aktivitásban. Az eredmények igazolják, hogy az általunk vizsgált antocianinok az  $\alpha$ -amiláz enzim -1, -2, -3 alhelyeire bekötődnek, biztosítva ezzel az inhibíciós aktivitást. A malvidin-3,5-diglükózid, szemben a cianidin-glikozidokkal rendkívül stabilan képes kötődni az enzim aktív centrumához. Minél jobb egy inhibitor molekula kötődése az enzim aktív helyén, annál nehezebb a szubsztrátnak kiszorítani a versengés során. Ezzel magyarázható, hogy a malvidin-3,5-diglükózidnak jobb az inhibíciós aktivitása, mint a többi standardnak, valamint, hogy a 'Cigánymeggy 59' jobb inhibitora a humán nyálamiláz enzimnek, mint a 'VN1' meggyfajta.

*Meggykivonatot tartalmazó rágógumi hatásának vizsgálata a nyál amilázaktivitásra és a Streptococcus mutans szám változására pilot clinical study-ban:*

A klinikai vizsgálat során először meghatároztuk a nyugalmi nyál amilázaktivitást a kontroll és kezelt csoportokban. Az eredmények, statisztikai kiértékelése kor és nem szerint történt. A három korcsoport nyugalmi nyál amilázaktivitása nem mutatott szignifikáns különbséget. Továbbá a három korcsoportban megvizsgált nyugalmi nyál amilázaktivitások nem, mutattak szignifikánsan különbséget a férfiak és nők között.

30 percen át vizsgáltuk a meggykivonatot tartalmazó rágógumi hatását a nyál amilázaktivitásra. Eredményeinket a kontroll csoport eredményeivel hasonlítottuk össze. A kontroll és kezelt csoportoknál az első mintavétel során vett nyálminták amilázaktivitása alacsony volt mindkét csoportban. Ennek az a magyarázata, hogy a nyugalmi nyálban az  $\alpha$ -amiláz enzim konformációjára a harmadlagos szerkezet jellemző, mely nem teszi lehetővé a szubsztrát kötődését. A második (rágás utáni) mintavételnél látható, hogy az intenzív rágás hatására szignifikánsan nőtt a nyál amilázaktivitása mindkét csoportban. Ennek az a magyarázata, hogy rágás hatására kialakult az inger nyál. Az inger nyál ionösszetétele jelentősen különbözik a nyugalmi nyáltól. Az inger nyálban nő a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , és a  $\text{Cl}^-$  koncentrációja. Mint ismeretes az  $\alpha$ -amiláz egy allosztérikus enzim, amely azt jelenti, hogy egy allosztérikus aktivátornak kötődnie kell az enzimhez ahhoz, hogy az enzimre jellemző negyedleges szerkezete kialakuljon. Az enzim allosztérikus aktivátora a  $\text{Cl}^-$  ion. Az intenzív rágás hatására, kialakult az inger nyál, mely az enzim számára, megfelelő környezetet biztosított a konformáció változáshoz. Azaz kialakult a nyálamilázra jellemző negyedleges szerkezet. Így a második mintavételi időpontban gyűjtött nyálmintákra jellemző amilázaktivitás szignifikánsan nő mindkét csoportban. Az egytényezős ismételt mérés ANOVA szignifikáns időhatást mutatott ( $p < 0,05$ ). A harmadik mintavételnél az látható, hogy a rágás utáni 10 percben vett nyálminták amilázaktivitása a kezelt (meggykivonatot tartalmazó rágó) csoportban szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz képest. Ez azt jelenti, hogy a meggykivonatban lévő antocianinok bekötődtek az enzim aktív centrumába. A negyedik és ötödik mintavételi ponton gyűjtött nyálminták enzimaktivitásáról az mondható el, hogy a kezelt csoportnál tovább csökken az aktivitás, megközelíti a nyugalmi nyálra jellemző aktivitás értéket. Ebből következik, hogy az antocianinban dús meggykivonatot tartalmazó rágógumi rágása közben felszabadult antocianinok, a vizsgálati idő alatt, azaz harminc percen keresztül gátolták a keményítő bontását a szájüregben. Ezen

eredményekkel igazoltuk, hogy az antocianinban dús meggykivonatnak jelentős szerepe lehet a fogszuvasodás prevenciójában, azaz a szájüregi egészség megőrzésében.

A kérdőívre adott válaszok statisztikai értékelése során kiderült, hogy a fogíny vérzés gyakorisága és a fogselyem használata növelte a nyugalmi nyál amilázaktivitást, mely magyarázható a gyulladás hatásával. Meglepő módon a rendszeres rágógumi használat csökkentette a nyugalmi nyál amilázaktivitás szintjét, bár a hatás nem volt szignifikáns.

A szájüregi státust a három kezelt csoportban is vizsgáltuk. Nem meglepő, hogy a DMF-T értékek átlaga magasabb volt az idősebb pacienseknél. A felnőttek nyál amilázaktivitás értékei magasabbak voltak, azon önkéntesek esetében, akiknek több szuvas foga volt, a gyermekeknél nem tapasztaltuk ezt a hatást. A korreláció szignifikáns volt a felnőttek esetében, és pozitív lineáris összefüggést találtunk mindkét felnőtt korcsoportban. Eredményeink azt mutatják, hogy a magasabb nyál amilázaktivitás magasabb DMF-T-szintet eredményezett a 18 és 20 év közötti, valamint a 30 év feletti korcsoportban.

Nincs szignifikánsan különbség a három korcsoport között a nyugalmi nyálban mért *S. mutans* telepek számára vonatkozóan és ezen értékeket nem befolyásolta a nem. A *S. mutans* telepek számát kiértékeljük, a három korcsoport, valamennyi kontroll és kezelt önkéntesénél. A *S. mutans* telepszám szignifikánsan különbözött a korcsoportok között a rágást követően.

30 percen át vizsgáltuk a meggykivonatot tartalmazó rágógumi hatását a *Streptococcus mutans* számra. Eredményeinket a kontroll csoport eredményeivel hasonlítottuk össze.

A kontroll és a kezelt csoportoknál hasonlóan alacsony kezdeti *S. mutans* szint látható a rágás előtti, a nyugalmi nyálmintákban. Ennek az az oka, hogy a baktériumok a biofilmhez kötött, azaz szesszilis módon fordulnak elő. Így a nyugalmi nyálminták *S. mutans* szintje rendkívül alacsony a kontroll és a kezelt csoportoknál egyaránt.

Közvetlenül a rágás utáni mintavételnél az látható, hogy a *S. mutans* egyedszám a kontroll és a kezelt csoportoknál egyaránt nő. A hatás szignifikáns a kezelt csoport valamennyi korcsoportjánál szemben a kontrollal. Ennek az a magyarázata, hogy az intenzív rágás hatására a biofilm egysége megbomlik és nagy mennyiségű *S. mutans* kerül a szájüregbe. A harmadik mintavételből származó nyálminták *S. mutans* szintje jelentősen csökken a kezelt csoport valamennyi korcsoportjánál, szemben a kontroll csoporttal. Ez azzal magyarázható, hogy a meggykivonatban lévő antocianinok gátolják a *S. mutans* kötődését a biofilmhez. Az intenzív rágás következtében nagy mennyiségben termelődik

a nyál, mely a folyamatos nyelésnek köszönhetően az adhézióra nem képes mikroorganizmusok kiürülését segíti a szájüregből szemben a kontroll csoporttal. A negyedi és ötödik mintavételnél az látható, hogy a meggykivonatot tartalmazó rágógumit használóknál a *S. mutans* telepszám megközelíti a nyugalmi nyál *S. mutans* szintjét, valamennyi korcsoportban, szemben a kontroll csoporttal. Ebből arra lehet következtetni, hogy az antocianinban dús meggykivonatot tartalmazó rágógumi rágása közben felszabaduló antocianinok, a vizsgálati idő alatt, azaz 30 percig folyamatosan gátolt volt a *S. mutans* baktériumok adhéziója a biofilmhez. A folyamatos rágás következménye, hogy a keletkező nagymennyiségű nyál hatására az a szájüregből ezen mikroorganizmusok ki is ürültek.

Ezen eredményekkel igazoltuk, hogy az antocianinban dús meggykivonatnak jelentős szerepe lehet a fogszuvasodás prevenciójában, azaz a szájüregi egészség megőrzésében.

A kérdőívre adott válaszok statisztikai értékelésekor, három esetben szignifikáns különbség volt a kontroll és a kezelt csoportok között.

Jelentős különbség a kiindulási *S. mutans* szintben az allergiás és nem allergiás betegek között volt. Ezenkívül a már korábban említett szájszárazság és a fogíny vérzés gyakorisága csökkentette, míg a fogselyem és a szokásos rágógumi használata a *S. mutans* sejtek számát növelte.

Az egyszempontú ismételt méréses ANOVA három esetben, (fogselyem használat, fogstátusz, szájszárazság) szignifikáns különbséget mutatott a kontroll és a kezelt csoportok között

A kezelt csoportnál, akik meggykivonatot tartalmazó rágógumit rágtak, a rágás után 20 perccel a *S. mutans* szám szignifikánsan csökkent, akár használtak rendszeresen fogselymet, akár nem. Ennek a magyarázata az lehet, hogy a rágógumi használat során kialakuló rágó és szivattyúzó mozgás következtében a stabil biofilm megváltozik, melyet a rágóban lévő meggykivonat tovább erősített, ami a *S. mutans* telep számának szignifikáns csökkenésében nyilvánult meg.

A fogstátusz esetén, a kezelt csoportban (akik meggykivonatot tartalmazó rágót rágtak) a szuvasfoggal rendelkezőkre (DS>0) és a szuvasfoggal nem rendelkezőkre (DS=0) egyaránt jellemző, hogy rágás utáni nyálmintákban megnövekedett a *S. mutans* szám. Míg a rágás utáni 10. és 20. percből származó nyálmintáknál rendkívül alacsony volt a baktériumszám. A kezelt csoporton (DS>0 és DS=0) belül a különbségek teljesen eltűntek. Ezen hatás oka a meggykivonatban keresendő. *In vitro* kísérletekkel korábban igazolták, hogy a meggy gyümölcs a szájüregi egészséget befolyásoló baktericid hatással

rendelkezik (Hevesi és mts., 2012). A különbség szignifikánsan magasabb volt a stimulált nyálban. A szájszárazságnál, a rágas után a kontroll és kezelt csoportoknál egyaránt magas volt a S. mutáns szám, szemben azokkal, akik nem szenvednek szájszárazságban. Ez azzal magyarázható, hogy a csökkent nyáltermelés hatására a pangó bomlás termékek jó táptalajt biztosítanak a baktériumoknak. A kezelt csoportnál azt láthatjuk, hogy a 20 perctől a kategóriák közötti különbségek teljesen eltűntek.

#### *Melatonin eredmények:*

Vizsgáltunk egy másik biológiailag aktív vegyület, a melatonin koncentrációját a korábban említett meggyfajtákban. Ezen molekula koncentrációjának meghatározását azért találtuk fontosnak mert a tanulmányok szerint a melatonin képes csökkenteni a kialakult biofilm életképességét, gátolja a biofilm képződést (Zhou és mts. 2016)

Munkánk során alkalmazható kromatográfiás eljárást dolgoztunk ki, a melatonin kvalitatív és kvantitatív meghatározására. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a magyarországi meggyfajtáknak magas a melatonin koncentrációja. A 'Cigánymeggy 59' és a 'Debreceni bőtermő' fajtáknak szignifikánsan nagyobb a melatonin koncentrációja szemben a többi fajtával ( $p < 0,05$ ). A meggy extraktumokat tovább tisztítottuk preparatív HPLC-s technikával, és MALDI-TOF MS elemzéssel m/z érték alapján azonosítottuk a melatonint, melynek molekula tömege: 232,29 Da.

## 10. SUMMARY

### *Results of analysing sour cherry extract:*

Dry-content of each sour cherry varieties was investigated and we found that 'VN1' variety has the highest dry-content (19,32%) and 'Cigánymeggy 59' has the lowest dry-content (14,12%). Then the total anthocyanin concentration of these sour cherry varieties was determined by isolation with pH differential method and solid phase extraction (SPE).

According to our results, 'Cigánymeggy 59' has significantly higher anthocyanin concentration ( $p < 0,05$ ).

Anthocyanin profiles of the sour cherry varieties were determined by UHPLC, a suitable chromatographic method was developed for qualitative and quantitative analysis of the components. In case of all studied varieties, the concentration of cianidin-3-rutinoside was the highest. The anthocyanin concentration of 'VN1' variety was significantly the highest. The major components of sour cherry were determined by MALDI-TOF mass spectrometer and we proved that the peaks contain one substance, other molecules with similar chromatographic features cannot be found in each peak. According to the  $m/z$  values, three major components were identified: cianidin-3-glucosil-rutinoside 757,5 Da, cianidin-3-glucoside 449,1 Da, cianidin-3-rutinoside 595,6 Da. Several smaller nathocyanin components were determined in sour cherry extracts with HPLC.

Anthocyanin concentration of 'VN1' in the 'Bosnyák' landraces group is 295 mg/100g fresh wight. On the basis of one-variable ANOVA, VN1 has significantly the anthocyanin concentration mean values for fresh and dry weight in connection with cigánymeggy varieties in the 'Cigánymeggy 59' and the 'Kántorjánosi' kind of circle ( $p < 0,05$ ). Varieties of the 'Kántorjánosi' kind of circle have lower anthocyanin concentration, 'Debreceni bőtermő': 171 mg/100g; 'Kántorjánosi': 121 mg/100g; 'A': 112 mg/100g for fresh weight. For our surprise, 'Cigánymeggy 59' has a very high anthocyanin concentration: 342 mg/100g for fresh weight.

Antioxidant capacity of each anthocyanin standard was determined. The difference among the results of fat-soluble antioxidant capacity of the studied anthocyanin standards was not significant ( $p < 0,05$ ). Water-soluble antioxidant capacity of standards was more lower than fat-soluble capacity in every case, so we can conclude that anthocyanin

standards soluble in alcohol better than in water. We studied the fat- and water-soluble antioxidant capacity of the five Hungarian sour cherry varieties with photochemiluminescent method. 'VN1' variety has significantly high water- (ACW) and lipid- soluble (ACL) antioxidant capacity.

*Effect of anthocyanins and sour cherry extract on the activity of human saliva amylase:*

Inhibitory activity of sour cherry extract and some anthocyanins was studied in the presence of human saliva amylase on GalG<sub>2</sub>-CNP substrate (EC 3.2.1.1). We firstly proved that sour cherry extracts and some anthocyanins can inhibit in  $\mu\text{M}$  concentration, we determined the type of inhibitory, which inhibits in a purely competitive way.

IC<sub>50</sub> was determined for characterising sour cherry extracts and pure anthocyanin structures. So malvidin-3,5-diglucoside has the highest inhibitory activity. Then cianidin-3-glucoside, cianidin-3-rutinoside follow and finally malvidin-3-glucoside has the lowest inhibitory activity. IC<sub>50</sub> values of each sour cherry extract were determined. We found that 'Cigánymeggy 59' and 'Debreceni bőtermő' are better inhibitors than the other sour cherry extracts. Good inhibitory feature of 'Cigánymeggy 59' correlates with its high anthocyanin content, while 'Debreceni bőtermő' has better inhibitory activity than we calculated from its anthocyanin content which refers to the presence of other inhibitory compounds.

Bonding of our studied anthocyanin structures to the active center of HSA was modelled *in silico*. As we know, the occupancy of -1, -2, -3 subplaces of the human saliva amylase enzyme play a central role in the catalytic activity. Our results show that the studied anthocyanins bond into the -1, -2, -3 subplaces of  $\alpha$ -amylase enzyme providing inhibition activity. Opposite the cianidin-glucosides, malvidin-3,5-diglucoside can stable bond into the active center of the enzyme. The better the bonding of an inhibitor molecule is in the active place of the enzyme, the more difficult the substrate can supersede it during the competition. This can explain that malvidin-3,5-diglucoside has better inhibitory activity than the other standards and 'Cigánymeggy 59' is better inhibitor of the human saliva amylase enzyme than 'VN1' sour cherry variety.

*Investigation of the effect of chewing gum with sour cherry extract on the activity of saliva amylase and change of the number of Streptococcus mutans in pilot clinical study:*

At first, in clinical investigation the rest saliva amylase activity was determined in control and treated groups. The statistic analysis of the results was made according to age and sex. We found that the rest saliva amylase activity of the three age groups did not show significant difference. Furthermore, the rest saliva amylase activity of the three age groups did not show significant difference between women and men.

The effect of chewing gum with sour cherry extract was investigated during 30 minutes and the results were compared with the control group. In control and treated groups amylase activity of the first taken saliva samples was low. This can be explained, that the conformation of the  $\alpha$ -amylase enzyme characterizes terciér structure which cannot allow the substrate to bond. In the second sample taking (after chewing) it can be seen that saliva amylase activity significantly increased in both groups because of intensive chewing. The stimulus saliva was formed by chewing. Ion composition of the stimulus saliva significantly differ from the rest saliva. In the stimulus saliva the concentration of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , és a  $\text{Cl}^-$  increases. As we know,  $\alpha$ -amylase is an allosteric enzyme, which means that one allosteric activator must bond to the enzyme in order to its quaternary structure formation. The allosteric activator of the enzyme is  $\text{Cl}^-$  ion. Stimulus saliva formed because of the intensive chewing which provided the right conditions to the enzyme for conformation change and the quaternary structure of the saliva amylase formed. In the second sample taking time, saliva amylase activity significantly increased in both groups. Repeated measuring ANOVA with one factor showed significant time effect ( $p < 0,05$ ).

In the third sample taking we can see that in the 10. minute after chewing the amylase activity significantly decreased in the treated group (chewing gum with sour cherry extract) in connection with the control group. This means that anthocyanins of the sour cherry extract bonded into the active center of the enzyme. In the 4. and 5. sample taking, the enzyme activity of the saliva decreased further in the treated group, it was near the activity of the rest saliva.

During chewing chewing gum which contains sour cherry extract rich in anthocyanin, anthocyanins released inhibited the demolition of the starch in the oral cavity in the experimental time (30 minutes). We verified that sour cherry extract rich in anthocyanins has a significant role in the prevention of caries and the preservation of oral health.

We statistically evaluated the answers of the questionnaire and found that the frequency of gum bleeding and the use of dental floss increased the rest saliva amylase activity which can explain the effect of inflammation. Surprisingly, the regular use of chewing gum decreased the level of the rest saliva amylase activity, but not significantly.

The oral condition was studied in the three treated groups. DMF-T values were higher by the elderly patients. Saliva amylase activity of adult patients was higher than those volunteers who have more decayed teeth, we did not experienced this effect by children. The correlation was significant by adults, and we found positive linear correlation in both adult age groups. Our results show that the higher saliva amylase activity resulted in higher DMF-T level in the groups between 18-20 years and over 30 years.

There was not significantly difference among the number of *S. mutans* colonies of the rest saliva in the three age groups and these values were not influenced by the sex. We evaluated the number of *S. mutans* colonies in the control and treated groups of the three age groups and it significantly differed among the age groups after chewing.

We studied the effect of the chewing gum with sour cherry extract on the number of *Streptococcus mutans* during 30 minutes. The results were compared to the control group. In control and treated groups there was similar beginning *S. mutans* level before chewing in the rest saliva samples. This is caused by bacteria bonding to the biofilm in a sessile way. So the *S. mutans* level of the rest saliva samples is very low in both the control and the treated groups.

In the samples right after chewing the number of *S. mutans* increased in both control and treated groups. The effect is significant in every treated age group opposite the control. The unit of the biofilm splits up for the effect of intensive chewing and large amount of *S. mutans* gets into the oral cavity. In the third sample taking saliva the level of *S. mutans* significantly decreased in every treated age group opposite the control groups. So anthocyanins of sour cherry extract inhibit bonding of *S. mutans* to the biofilm. Because of the intensive chewing large amount of saliva is produced which helps with emptying the microorganisms unable to adhesion from the oral cavity because of the continuous swallow opposite the control groups. In the 4. and 5. sample taking we can see the number of *S. mutans* colonies of those who use the chewing gum with sour cherry extract is near the level of *S. mutans* in the rest saliva in every age group opposite the control group. We can conclude that releasing anthocyanins during chewing chewing gum rich in sour cherry in the studied time (30 minutes) inhibit adhesion of *S. mutans* bacteria to the biofilm.

Because of the continuous chewing, the large amount of saliva empties the microorganisms from the oral cavity.

These results show that sour cherry extract rich in anthocyanin plays a significant role in prevention of caries and preserving the health of oral cavity.

Statistic evaluation of the answers to the questionnaire showed significant difference in three cases between control and treated groups.

Significant difference in the beginning level of *S. mutans* was between allergic and non-allergic patients. The frequency of the former mentioned dry mouth and bleeding gum decreased the number of *S. mutans* cells while dental floss and chewing gum increased it. One-variable ANOVA test showed significant difference in three cases (dental floss, tooth status, dry mouth) between control and treated groups.

In the treated group who chew chewing gum with sour cherry extract in the 20th minutes of chewing the number of *S. mutans* significantly decreased regardless of using dental floss. Because of chewing and pumping the stable biofilm changes, which was strengthened by the sour cherry extract in the chewing gum, so the number of *S. mutans* colonies significantly decreased.

In case of tooth status, in the treated group (chewing chewing gum with sour cherry extract) patients with caries ( $DS > 0$ ) and patients without caries ( $DS = 0$ ) had more *S. mutans* cells in their saliva after chewing. The samples from the saliva in the 10th and 20th minutes after chewing had very low bacteria number.

The differences in the treated group ( $DS > 0$  és  $DS = 0$ ) completely vanished. This was caused by sour cherry extract. *In vitro* experiments showed that sour cherry has bactericid effect which influences the health of oral cavity (Hevesi et al., 2012). The difference was significantly higher in the stimulated saliva. In case of dry mouth, the number of *S. mutans* cells was high in both control and treated groups opposite the patients who do not suffer from dry mouth. Because of the decreased saliva production the metabolites provide good broth to bacteria. In treated groups from the 20th minutes the differences between the categories completely vanished.

### *Melatonin results:*

We studied the concentration of another biologically active compound, melatonin in the mentioned sour cherry varieties. Measuring the concentration of this molecule is important because former studies wrote that melatonin could decrease the viability of the biofilm and block biofilm formation (Zhou és mts. 2016).

We developed a chromatographic method to identify melatonin by qualitative and quantitative methods. According to our results we found that Hungarian sour cherry varieties have significantly high melatonin concentration. 'Cigánymeggy 59' and 'Debreceni bőtermő' have significantly higher melatonin concentration than the other varieties ( $p < 0,05$ ).

Sour cherry extracts were further purified with preparative HPLC technique and identified with MALDI-TOF MS analysis on the basis of  $m/z$  value: molecule weight of melatonin is 232,29 Da.

## 11. IRODALOM

1. Absi E., Ayala A., Machado A., Parrado J.: 2000. Protective effect of melatonin against the 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced inhibition of Complex I of the mitochondrial respiratory chain. *J. Pineal Res.* 29: 40–47.
2. Acuña Castroviejo D., López L.C., Escames G., López A., García J.A., Reiter R.J.: 2011. Melatonin-mitochondria Interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem.* 11: 221–240.
3. Adisakwattana S., Yibchok-Anun S., Charoenlertkul P., Wongsasiripat N.: 2011. Cyanidin-3-rutinoside alleviates postprandial hyperglycemia and its synergism with acarbose by inhibition of intestinal  $\alpha$ -glucosidase. *J. Clin. Biochem.* 49. 1: 36–41.
4. Afifi M.; El-Kereamy A.; Legrand V.; Chervin C.; Monje M.-C.; Nepveu F.; Roustan J.-P.: 2003. Control of anthocyanin biosynthesis pathway gene expression by eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, in grape cell tissue cultures. *J. Plant Physiol.* 160. 971-975.
5. Ahmadi-Motamayel F., Goodarzi M.T., Jamshidi Z., Mahdavinezhad A., Rafieiane N.: 2016., Evaluation of salivary and serum alpha amylase level in dental caries of adoles- cence. *Braz. Dent. Sci.* 19. 40–46.
6. Akkarachiyasit S., Charoenlertkul P., Yibchokanun S., Adisakwattana S.: 2010. Inhibitory activities of cyanidin and its glycosides and synergistic effect with acarbose against intestinal  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Int. J. Mol. Sci.* 11. 3387-3396; doi:10.3390/ijms11093387
7. Altschul S.F., Wootton J.C., Gertz E.M., Agerwala R., Morgulis A., Schafer A.A., Yu Y.K.: 2005. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* 272: 5101-5109.
8. Anderson M.D., Prasad T.K., Stewart C.R.: 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.* 109. 1247–1257.
9. Aps J.K. - Martens L.C.: 2015. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci. Int.* 150. 119–131.
10. Archetti M.: 2000. The origin of autumn colours by coevolution. *J. Theor. Biol.* 205. 625–630.

11. Arhakis A., Karagiannis V., Kalfas S.: 2013. Salivary Alpha- Amylase Activity and Salivary Flow Rate in Young Adults. *Open Dent. J.* 7. 7–15.
12. Asada K.: 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50. 601–639.
13. Asada K.: 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355. 1419–1431.
14. Bae K., Jun E.J., Lee S.M., Paik D.I., Kim. J.B.: 2006. Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality. *Clin Oral Investig.* 10. 2: 102–7.
15. Balci Yuce H., Karatas O., Aydemir Turkal H., Pirim Gorgun E., Ocakli S., Benli I., Cayli S.: 2016. The effect of melatonin on bone loss, diabetic control, and apoptosis in rats with diabetes with ligature-induced periodontitis. *J Periodontol.* 87. 4: 35-43. doi: 10.1902/jop.2015.150315.
16. Balzer I.- Hardeland R.: 1996. Melatonin in algae and higher plants: possible new roles as a phytohormone and antioxidant. *Bot Acta.* 109: 180-183.
17. Ban T.; Ishimaru M.; Kobayashi S.; Shiozaki S.; Goto-Yamamoto N.; Horiuchi S.: 2003. Absciscic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in ‘Kyoho’ grape berries. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 78. 586-589.
18. Barceló A.R.; Calderón A.A.; Zapata J.M.; Muñoz R.: 1994. The histochemical localization of anthocyanins in seeded and seedless grapes (*Vitis vinifera*). *Sci. Hort.* 57. 265-268.
19. Belhadj A.; Telef N.; Saigne C.; Cluzet S.; Barrieu F.; Hamdi S.; Mérillon J.-M.: 2008. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiol. Biochem.* 46. 493-499.
20. Biró Gy.: 2003. Funkcionális élelmiszerek, természetes antioxidánsok szerepe az egészség megőrzésben. *Élelmezési Ipar.* 57. 14:17. 835-838.
21. Blando F., Gerardi C., Nicoletti I.: 2004. Sour cherry (*Prunus cerasus* L) anthocyanins as ingredients for functional foods. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 5. 253–258.

22. Blask D.E., Hill S.M., Dauchy R.T., Xiang S., Yuan L., Duplessis T., Mao L., Dauchy E., Sauer L.A.: 2011. Circadian regulation of molecular, dietary, and metabolic signaling mechanisms of human breast cancer growth by the nocturnal melatonin signal and the consequences of its disruption by light at night. *J Pineal Res.* 51: 259–269.
23. Bonerz D., Wurth K., Dietrich H., Will F.: 2007. Analytical characterization and the impact of ageing on anthocyanin composition and degradation in juices from five sour cherry cultivars. *European Food Research and Technology*. 224. 355–364.
24. Bowden G.H., Hardie J.M., Fillery E.D.: 1978. Microbial analyses related to caries susceptibility. In: Bibby B.G., Shern R.J., editors. *Proceedings, Methods of Caries Prevention*. London: Information Retrieval. 83–97.
25. Bowler C., van Montagu M., Inzé D.: 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43. 83–116.
26. Bradshaw D.J. - Marsh P.D.: 1998. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries Res.* 32: 456–462.
27. Bradshaw D.J., McKee A.S., Marsh P.D.: 1989. Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities in vitro. *J Dent Res.* 68: 1298–1302.
28. Bridle P. - Garcia-Viguera C.:1997. Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC. *Food Chemistry*. 59. 299–304.
29. Brouillard R.: 1982. Chemical structure of anthocyanins. *Anthocyanins as food colors*. P. Markakis. New York, Academic Press, Inc.
30. Brzozowski. A.M., Lawson D.M., Turkenburg J.P., Bisgaard-Frantzen H., Svendsen A., Torben V., Borchert T. V., Dauter Z., Wilson K.S., Gideon J., Davis G.J.: 2000. *Biochemistry*. 39. 9099-9107.
31. Burkhardt S., Tan D.X., Manchester L.C., Hardeland R. and Reiter R.J.: 2001. Detection and Quantification of the Antioxidant Melatonin in Montmorency and Balaton Tart Cherries (*Prunus cerasus*) *J. Agric. Food Chem.* 49. 4898–4902.
32. Cai Z.Q., Slot M., Fan Z.X.: 2005. Leaf development and photosynthetic properties of three tropical tree species with delayed greening. *Photosynthetica*. 43. 91–98.

33. Casano L.M., Gómez L.D., Lascano H.R., González C.A., Trippi V.S.: 1997. Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant Cell Physiol.* 38. 433–440.
34. Cassidy A., Mukamal K.J., Liu L., Franz M., Eliassen A.H., Rimm E.B.: 2013. High Anthocyanin Intake Is Associated With a Reduced Risk of Myocardial Infarction in Young and Middle-Aged Women. *Circulation.* 127. 2: 188-96. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.122408
35. Cassidy A., O'Reilly É.J., Kay C., Sampson L., Franz M., Forman J.P., Curhan G., Rimm E.B.: 2011. Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults. *Am J Clin Nutr.* 93: 338–47.
36. Cassidy A., Rogers G., Peterson J.J., Dwyer J.T., Lin H., Jacques P.F.: 2015. Higher dietary anthocyanin and flavonol intakes are associated with anti inflammatory effects in a population of US adults AJCN. doi: 10.3945/ajcn.115.108555.
37. Castellarin S.D.; Pfeiffer A.; Sivilotti P.; Degan M.; Peterlunger E.; Di Gaspero G.: 2007. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant Cell Environ.* 30. 1381-1399.
38. Chaovanalikit A. - Wrolstad R.E.: 2004. Anthocyanins and polyphenolic composition of fresh and processed cherries. *Journal of Food Science.* 69. FST73–FST83.
39. Charepalli V., Reddivari L., Vadde R., Walia S., Radhakrishnan S., Vanamala J.K.: 2016. Eugenia jambolana (Java Plum) fruit extract exhibits anti-cancer activity against early stage human HCT-116 colon cancer cells and colon cancer stem cells. *Cancers (Basel)* 8. 29: 1-11.
40. Chen J.Y.; Wen P.F.; Kong W.F.; Pan Q.H.; Wan S.B.; Huang W.D.: 2006. Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development. *J. Plant Physiol.* 163. 115-127.
41. Chen P.N., Chu S.C., Chiou H.L., Chiang C.L., Yang S.F., Hsieh Y.S.: 2005. Cyanidin 3-Glucoside and Peonidin 3-Glucoside Inhibit Tumor Cell Growth and Induce Apoptosis In Vitro and Suppress Tumor Growth In Vivo. *Nutrition and cancer.* 53. 2: 232–243.

42. Cheplick S., Kwon Y.I., Bhowmik P., ShettyK.: 2007. Clonal variation in raspberry fruit phenolics and relevance for diabetes and hypertension management. *Journal of Food Biochemistry*. 31. 656–679.
43. Choinski J.S. Jr., Ralph P., Eamus D.: 2003. Changes in photosynthesis during leaf expansion in *Corymbia gummifera*. *Aust. J. Bot.* 51. 111–118.
44. Chorti E.; Guidoni S.; Ferrandino A.; Novello V. 2010. Effect of different cluster sunlight exposure levels on ripening and anthocyanin accumulation in Nebbiolo grapes. *Amer. J. Enol. Viticult.* 61. 23-30.
45. Claustrat B. - Leston J.: 2015. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*. 61. 2-3: 77-84.
46. Conti A., Tettamandi C., Singaravel M., Haldar C., Pandi-Peruma R.S., Maestroni G.J.M.: 2002. Melatonin: an ubiquitous and evolutionary hormone. In: Haldar, C., Singaravel, M., Maitra, S. K. (Eds.), *Treatise on Pineal Gland and Melatonin*. Science Publishers. Enfield, USA. 105–143.
47. Cook A.D., Atsatt P.R., Simon C.A.: 1971. Doves and dove weed: multiple defenses against avian predation. *BioScience* 21. 277–281.
48. Cote G.L. - Tao B.Y.: 1990. Oligosaccharide synthesis by enzymatic transglycosylation. *Glycoconjugate J.* 7. 145-162.
49. Couée I., Sulmon C., Gouesbet G., El Amrani A.: 2006 Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 57. 449–459.
50. Cramton S.E., Gerke C., Schnell N.F., Nichols W.W., Gotz F.: 1999. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* 67. 5427–5433.
51. Czyzowska A. - Pogorzelski E.: 2004. Changes to polyphenols in the process of production of must and wines from blackcurrants and cherries. Part II. *Anthocyanins and flavanols Eur Food Res Technol.* 218. 355–359. DOI 10.1007/s00217-003-0857-2
52. Damar I. - Eksi A.: 2012. Antioxidant capacity and anthocyanin profile of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) juice. *Food Chemistry*. 135. 2910–2914.
53. Davies, G. J., Wilson, K. S. és Henrissat, B.: 1997. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal* **321**: 557-559.

54. Dawes C.: 1996. Factors influencing salivary flow rate and composition, in *Saliva and Oral Health*, ed. W. M. Edgar and D. M. O'Mullane, British Dental Association, London. 37–56.
55. De Ancos B., Gonzalez E., and Cano M. P.: 1999. Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und - Forschung A*, 208. 1. 33-38. DOI 10.1007/s002170050371.
56. de la Rocha N., Rotelli A., Aguilar C. F., Pelzer L.: 2007. “Structural basis of the anti-inflammatory activity of melatonin.” *Arzneimittel-Forschung*. 57. 12: 782–786.
57. de Soet J.J., Nyvad B., Kilian M.: 2000. Strain-related acid production by oral streptococci. *Caries Res*. 34: 486–490.
58. Deshpande A. - Jadad A.R.: 2008. The impact of polyol containing chewing gums on dental caries; a systematic review of original randomized controlled trials and observational studies. *Journal of American Dentist Associations*. 139. 1602-1614.
59. Dibdin G.H. - Shellis R.P.: 1988. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. *J Dent Res* 67: 890–895.
60. Dóka O., Ficzek G., Bicanic D., Spruijt R., Luterotti S., Tóth M., Buijnsters J.G., Végvári Gy.: 2011. Direct photothermal techniques for rapid quantification of total anthocyanin content in sour cherry cultivars. *Talanta*. 84. 341–346.
61. Dopfel P., Schulmeister K., Schernhammer E.S.: 2007. Nutritional and lifestyle correlates of the cancer-protective hormone melatonin. *Cancer Detection and Prevention*. 31: 140-148.
62. Duarte S., Gregoire S., Singh A.P., Vorsa N., Schaich K., Bowen W.H., Koo H.: 2006. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. *FEMS Microbiol Lett*. 257. 50–56.
63. Edga W.M.: 1992. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br. Dent. J*. 172. 305–312.
64. Edwardsson S.: 1968. Characteristics of caries-inducing human streptococci resembling *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*. 13: 637–646.
65. El-Kereamy A.; Chervin C.; Roustan J.-P.; Cheynier V.; Souquet J.-M.; Moutounet M.; Raynal J.; Ford C.; Latché A.; Pech J.-C.; Bouzayen M.: 2003. Exogenous

- ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Physiol. Plant.* 119: 175-182.
66. Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G.: 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of low density lipoproteins. *Free Rad. Biol. Med.* 13: 341-390.
  67. Featherstone J.D., Adair S.M., Anderson M.H., Berkowitz R.J., Bird W.F., Crall J.J., Den Besten P.K., Donly K.J., Glassman P., Milgrom P., Roth J.R., Snow R., Stewart R.E.: 2003. Caries management by risk assessment: consensus statement. *J Calif Dent Assoc.* 31: 257–69.
  68. Featherstone J.D.B.: 2004. The continuum of dental caries—evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res.* 83: C39–42.
  69. Fejerskov O., Kidd E.A.M.: 2003. eds. Dental caries: the disease and its clinical management. Copenhagen, Denmark. Blackwell Monksgaard.
  70. Feng G., Klein M.I, Gregoire S., Singh A.P., Vorsa N., Koo H: 2013. The specific degree-of-polymerization of a-type proanthocyanidin oligomers impacts *Streptococcus mutans* glucan-mediated adhesion and transcriptome responses within biofilms. *Biofouling.* 29: 629–640.
  71. Ferretti G., Bacchetti T., Bellaggia A., Neri D.: 2010. Cherry antioxidants: from farm to table. *Molecules.* 15: 10: 6993–7005.
  72. Ficzek G., Végvári G., Sándor G., Stéger-Máté M., Kállay E., Szügyi S., Tóth M.: 2011. HPLC evolution of anthocyanin components in the fruits of Hungarian sour cherry cultivars during ripening. *Journal of Food Agriculture & Environment.* 9: 1: 132–137.
  73. Fitzgerald R.J.: 1968. Plaque microbiology and caries. *Ala J Med Sci.* 5: 239–246.
  74. Folke L.E., Gawronski T.H., Staat R.H., Harris R.S.: 1972. Effect of dietary sucrose on quantity and quality of plaque. *Scand J Dent Res.* 80: 529–533.
  75. Ford C.M.; Boss P.K.; Hoj P.B.: 1998. Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP- glucose: flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize Bronze-1 locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins *in vivo*. *J Biol. Chem.* 273: 9224-9233.
  76. Galano A., Tan D.X., Reiter R.J.: 2013. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMKJ. *Pineal Res.* 54: 245–257. Doi:10.1111/jpi.12010

77. Galley H.F.: 2010. Bench-to-bedside review: Targeting antioxidants to mitochondria in sepsis Galley. *Critical Care*. **14**. 230: 1-9.
78. Garofulic I.E., Dragovic -Uzelac V., Jambrak A.R., Jukic , M.: 2013. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. *Marasca*). *Journal of Food Engineering*. 117. 437–442.
79. Gawronski T.H., Staat R.A., Zaki H.A., Harris R.S., Folke L.E.: 1975. Effects of dietary sucrose levels on extracellular polysaccharide metabolism of human dental plaque. *J Dent Res*. 54: 881–890.
80. Gálné Remenyik J.: 2007. Oligoszacharidok előállítása kemoenzimatisz szintézissel. Debreceni Egyetem. Debrecen.
81. Gibson S.: 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol*. 8. 93–102.
82. Gilad E., Salvatore Cuzzocrea S., Basilia Zingarelli B., Andrew L. Salzman A.L., and Szabó Cs.: 1997. Melatonin Is A Scavenger Of Peroxynitrite. *Life Sciences*. 60. 10: 169-174.
83. Givnish T.J.: 1990. Leaf mottling: relation to growth form and leaf phenology and possible role as camouflage. *Funct. Ecol*. 4. 463–474.
84. Goncalves B., Landbo A.K., Knudsen, D., Silva Ana P., Montiho-Pereira J., Rose E., Meyer A.S.: 2004. Effect of ripeness and postharvest storage on the phenolic profiles of cherries (*Prunus avium* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52. 523–530.
85. González-SanJosé M.L. - Diez C.: 1992. Relationship between anthocyanins and sugars during the ripening of grape berries. *Food Chem*. 43. 193-197.
86. Gould K.S., Lister C.: 2005. Flavonoid functions in plants. In: Andersen, Ø.M. and Markham, K.R. (Eds), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. CRC Press, Boca Raton. 397–441.
87. Gray G.M., Lally B.C., Conklin K.A.: 1979. Action of intestinal sucrase-isomaltase and its free monomers on an  $\alpha$ -limit dextrin. *The Journal of Biological Chemistry*. 254. 6038–6043.
88. Gregoire S., Singh A.P., Vorsa N., Koo H.: 2007. Influence of cranberry phenolics on glucan synthesis by glucosyltransferases and *Streptococcus mutans* acidogenicity. *J Appl Microbiol*. 103. 5: 1960–1968. [PubMed: 17953606]

89. Grotewold E.: 2001, Subcellular trafficking of phytochemicals. *Recent Res Devel Plant Physiol.* 2: 31-48
90. Guo H., Ling W., Wang Q., Liu C., Hu Y., Xia M.: 2008. Cyanidin 3-glucoside protects 3T3-L1 adipocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- or TNF- $\alpha$ -induced insulin resistance by inhibiting c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase activation. *Biochemical pharmacology.* 75. 1393–1401.
91. Gyémánt Gy., Kandra L. Nagy V. Somsák L.: 2003. Inhibition of human salivary  $\alpha$ -amylase by glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312. 2. 334-339.
92. Hamilton W.D., Brown S.P.: 2001. Autumn tree colours as a handicap signal. *Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B: Biol. Sci.* 268. 1489–1493.
93. Hara M., Iigo M., Ohtani-Kaneko R., Nakamura N., Suzuki T., Reiter R.J., Hirata K.: 1997. Administration of melatonin and related indoles prevents exercise-induced cellular oxidative changes in rats. *Biol Signals.* 6: 90–100.
94. Hara M., Oki K., Hoshino K., Kuboi T.: 2003 Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyl. *Plant Sci.* 164. 259–265.
95. Harborne J.B.:1982. Introduction to Ecological Biochemistry. *Academic Press.* London.
96. Hardeland R. - Pandi-Perumal S.R.: 2005. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutrition & Metabolism.* 2. 22: 1-15. doi:10.1186/1743-7075-2-22
97. Hardeland R., Madrid J.A., Tan D.X., Reiter R.J.: 2012. Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J Pineal Res.* 52: 139–166.
98. Hayashi Y., Ohara N., Ganno T., Ishizaki H., Yanagiguchi K.: 2007a. Chitosan-containing gum chewing accelerates antibacterial effect with an increase in salivary secretion. *J Dent.* 35. 11: 871–4.
99. Hayashi Y., Ohara N., Ganno T., Yamaguchi K., Ishizaki T., Nakamura T., Sato M.: 2007b. Chewing chitosan-containing gum effectively inhibits the growth of cariogenic bacteria. *Arch Oral Biol.* 52. 3: 290–4.

100. Hearty A., Lau A., Roberts A.: 2014. Chewing gum in Europe: A survey intakes in France, Germany, Italy, Spain and the UK. *Food Additives and Contaminants: Part A*. 31. 7: 1147-1157.
101. Heller W., Forkmann G., Britsch L., and Griseback H.: 1985. Enzymatic reduction of (+) - dihydroflavonols to flavan-3,4-cis-diols with flower extracts from *Matthiola incana* and its role in anthocyanin biosynthesis. *Planta* 165. 284-287.
102. Henry R.J., Battershell V.G., Brennan P.S., Oono K.: 1992. Control of wheat amylase using inhibitors from cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 58. 2: 281-284.
103. Hernandez-Ruiz J. - Arnao M.: 2008. Melatonin stimulates the expansion of etiolated lupin cotyledons. *Plant Growth Regulation*. 55. 1: 29–34.
104. Hernandez-Ruiz J. - Cano A.: 2004. Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues. *Planta*. 220: 140-144.
105. Hetherington M.M., Regan M.F.: 2011. Effects of chewing gum on short-term appetite regulation in moderately restrained eaters. *Appetite*. 57. 475-482.
106. Hevesi M., Blázovics A., Kállay E., Végh A., Stéger-Máté M., Ficzek G., Tóth M.: 2012. Sour Cherry Activity on Bacterial Flora in Human Saliva in vitro. *Food Technol. Biotechnol*. 50. 117–122.
107. Hinton H.E.: 1973. Natural deception. In: Gregory R.L. and Gombrich E.H. (Eds.), *Illusion in Nature and Art*. Duckworth, London. 97–159.
108. Hoch W.A., Singaas E.L., McCown B.H.: 2003. Resorption protection. Anthocyanins facilitate nutrient recovery in autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. *Plant Physiol*. 133. 1296–1305.
109. Hoch W.A., Zeldin E.L., McCown B.H.: 2001. Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence. *Tree Physiol*. 21. 1–8.
110. Hrotkó Károly.: 2003. *Cseresznye és meggy*. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
111. Hughes N.M. - Smith W.K.: 2007. Attenuation of incident light in *Galax urceolata* (*Diapensiaceae*): concerted influence of adaxial and abaxial anthocyanic layers on photoprotection. *Am. J. Bot*. 94. 784–790.
112. Humphrey S.P. - Williamson R.T.: 2001. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J. Prosthet. Dent*. 85 162–169.
113. Itthagarun A. - Wei. S.: 1997. Chewing gum and saliva in oral health. *J Clin Dent*. 8. 159–62.

114. Jacob R.A., Spinozzi G.M., Simon V.A., Kelley D.S., Prior R.L., Hess-Pierce B., Kader A.A.: 2003. Consumption of cherries lowers plasma urate in healthy women. *Journal of Nutrition*. 133. 6: 1826–1829.
115. Jahnke L.S., Hull M.R., Long, S.P.: 1991. Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*. *Plant Cell Environ*. 14. 97–104.
116. Janecek S.: 1995. Close evolutionary relatedness among functionally distantly related members of the (alpha/beta)8-barrel glycosyl hydrolases suggested by the similarity of their fifth conserved sequence region. *FEBS Lett*. 377. 1: 6-8.
117. Jarrett S.J., Marschke R.J., Symons M.H., Gibson C.E., Henry R.J., Fox G.P.: 1997. Alpha-amylase/subtilisin inhibitor levels in Australian barleys. *Journal of Cereal Science* 25. 261-266.
118. Jayaprakasam B., Shaiju K., Vareed L., Olson k., and Nair M.G.: 2005. Insulin Secretion by Bioactive Anthocyanins and Anthocyanidins Present in Fruits *J. Agric. Food Chem*. 53. 28–31
119. Jeong S.T.; Goto-Yamamoto N.; Kobayashi S.; Esaka M.: 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Sci*. 167. 247-252.
120. Jing P., Bomser J.A., Schwartz S.J., He J., Magnuson B.A., Giusti M.M.: 2008. Structure- function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56. 20: 9391–9398.
121. Kahkönen M. P. - Heinonen M.: 2003. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J. Agr. Food Chem*. 51. 3: 628–633.
122. Kamei H., Kojima T., Hasegawa M., Koide T., Umeda T., Yukawa T., Terabe K.: 1995. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Investigation*. 13. 6: 590–594.
123. Kandra L., Gyémánt G., Remenyik J., Ragunath C. és Ramasubbu N.: 2003. "Subsite mapping of human salivary alpha-amylase and the mutant Y151M." *FEBS Lett* 544 (1- 3): 194-198.
124. Kandra L., Gyémánt G., Zajác Á., Batta G.: 2004. Inhibitory effects of tannin on human salivary alpha-amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 319. 1265–1271.

125. Kidd E.: 2005. *Essentials of Dental Caries: The Disease and Its Management: The disease and its management*. New York, Oxford University Press.
126. Kidd E.A., Fejerskov O.: 2004. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res.* 83: C35–38.
127. Kim D., Heo H.J., Yang H.S., Lee C.Y.: 2005. Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53: 26. 9921–9927.
128. Kim J.S., Kwon C.S., Son K.H.: 2000. Inhibition of alpha- glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 2458–2461.
129. Kirakosyan A., Gutierrez E., Ramos Solano B., Seymour E. M., Bolling S.F.: 2018. The inhibitory potential of Montmorency tart cherry on key enzymes relevant to type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Food Chemistry.* 252. 142–146.
130. Kirakosyan A., Seymour E.M., Noon K.R., Urcuyo Llanes D.E., Kaufman P.B., Warber S.L., Bolling S.F.: 2010. Interactions of antioxidants isolated from tart cherry (*Prunus cerasus*) fruits. *Food Chemistry.* 122. 78–83.
131. Kirakosyan A., Seymour E.M., Urcuyo Llanes D.E., Kaufman P.B, Bolling S.F.: 2009. Chemical profile and antioxidant capacities of tart cherry products *Food Chemistry.* 115. 20-25. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.11.042
132. Knaup B., Oehme A., Valotis A., Schreier P.: 2009. Anthocyanins as lipoxygenase inhibitors. *Mol. Nutr. Food Res.* 53. 617 – 624. DOI 10.1002/mnfr.200800234
133. Kolenbrander P.E.: 2000. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Ann. Rev. Microbiol.* 54. 413–437.
134. Konar N., Palabiyik I., Toker O.S., Sagdic O.: 2016. Chewing gum: Production, quality parameters and opportunities for delivering bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology.* 55 29-38.
135. Konczak I. - Zhang W.: 2004. Anthocyanins-More Than Nature's Colours. *J Biomed Biotechnol.* 5. 239-240. DOI 10.1155/s1110724304407013.
136. Kong J.M., Chia L.S., Goh N.K., Chia T.F., Brouillard R.: 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins *Phytochemistry* 64. 923–933.

137. Konturek S.J., Konturek P.C., Brzozowska I., Pawlik M., Sliwowski Z., Czesnikiewicz-Guzik M., Kwiecień S., Brzozowski T., Bubenik G.A., Pawlik W.W.: 2007. Localization And Biological Activities Of Melatonin In Intact And Diseased Gastrointestinal Tract (GIT) *Journal of physiology and pharmacology* 58. 3: 381-405.
138. Kreuzaler F. - Hahlbrock K.: 1975. Enzymic synthesis of an aromatic ring from acetate units. Partial purification and some properties of flavanone synthase from cell-suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Eur J Biochem.* 56. 205-213.
139. Krol D.M.: 2003. Dental caries, oral health, and pediatricians. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 33: 253–70.
140. Kuk Y.I., Shin J.S., Burgos N.R., Hwang T.E., Han O., Cho B.H., Jung S., Guh J.O.: 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Sci.* 43. 2109–2117
141. Lee J., Durst R.W., Wrolstad R. E.: 2005. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International.* 88. 1269- 1278.
142. Lee J., Rennaker C., Wrolstad R.E.: 2008. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry.* 110. 782–786.
143. Lee S.H., Park S.M., Park S.M., Park J.H., Shin D.Y., Kim G.Y., Ryu C.H., Shin S.C., Jung J.M., Kang H.S., Lee W.S., Choi Y.H.: 2009. Induction of apoptosis in human leukemia U937 cells by anthocyanins through down-regulation of Bcl-2 and activation of caspases. *Int J Oncol.* 34: 1077–1083.
144. Lernet A.B., Case J.D., Heinzelmann R. V.: 1959. Structure of melatonin. *Journal of the American Chemical Society.* 81: 6084–6085.
145. Lernet A.B., Case J.D., Takahashi Y., Lee T.H., Mori W.: 1958. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society.* 80: 2587
146. Lev-Yadun S. - Ne`eman G.: 2004. When may green plants be aposematic? *Biol. J. Linn. Soc.* 81. 413–416.

147. Lev-Yadun S., Dafni A., Flaishman M.A., Inbar M., Izhaki I., Katzir G., Ne'eman G.: 2004. Plant coloration undermines herbivorous insect camouflage. *BioEssays* 26. 1126–1130.
148. Lev-Yadun S., Inbar M.: 2002. Defensive ant, aphid and caterpillar mimicry in plants. *Biol. J. Linn. Soc.* 77. 393–398.
149. Lev-Yadun S.: 2003a. Why do some thorny plants resemble green zebras? *J. Theor. Biol.* 244. 483–489.
150. Lev-Yadun S.: 2003b. Weapon (thorn) automimicry and mimicry of aposematic colorful thorns in plants. *J. Theor. Biol.* 244. 183–188.
151. Lev-Yadun S.: 2006. Defensive coloration in plants: a review of current ideas about antiherbivore coloration strategies. In: Teixeira da Silva, J.A. (Ed.), *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*, Volume IV. Global Science Books, London. 292–299.
152. Lev-Yadun S.: 2001. Aposematic (warning) coloration associated with thorns in higher plants. *J. Theor. Biol.* 210. 385–388.
153. Li N., Liu J.H., Zhang J., Yu B.Y.: 2008. Comparative evaluation of cytotoxicity and antioxidative activity of 20 flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56. 3876–3883.
154. Liang H., Wang Y., Wang Q., Ruan M.S.: 1999. Hydrophobic interaction chromatography and capillary zone electrophoresis to explore the correlation between the isoenzymes of salivary alpha-amylase and dental caries. *J. Chromatograph. B.* 724. 381–388.
155. Liang Y.J., Shyu K.G., Wang B.W., Lai L.P.: 2006. C-reactive protein activates the nuclear factor-kB pathway and induces vascular cell adhesion molecule-1 expression through CD32 in human umbilical vein endothelial cells and aortic endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 40: 412–20.
156. Lo Piparo E., Scheib H., Frei N., Williamson G., Grigorov M., Chou C. J. 2008. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human a-amylase. *Journal of Medicinal Chemistry.* 51. 12: 3555–3561.
157. Loesche W.J.: 1986. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiol Rev.* 50: 353–380.
158. Lowes D.A., Webster N.R., Murphy M.P., Galley H.F.: 2013. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve

- mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *British Journal of Anaesthesia* 110. 3: 472–80.
159. Lugasi A. - Blázovics A.: 2004. Az egészséges táplálkozás tudományos alapjai, 4 Számú útmutató az egészség megőrzéséhez. Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest.
160. Lüttge U.: 1997. *Physiological Ecology of Tropical Plants*. Springer-Verlag, Berlin.
161. Lyu S.Y. - Park W.B.: 2012. Photoprotective Potential of Anthocyanins Isolated from *Acanthopanax divaricatus* Var. *albeofructus* Fruits against UV Irradiation in Human Dermal Fibroblast Cells *Biomol Ther.* 20. 2: 201-206.
162. Maggi L., Conte U., Nhamias A., Grenier P., Vergnault G.: 2013. Evaluation of accelerated stability test conditions for medicated chewing gums. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 39.10: 1500-1507.
163. Mäkinen K.K.: 1989. Latest dental studies on xylitol and mechanism of action of xylitol in caries limitation. in *Progress in Sweeteners*, Grenby TH (ed), Elsevier, London, 331–62.
164. Mäkinen K.K., Mäkinen P.L., Pape H.R. J.R., Allen P., Bennett A., Isokangas P.J., Isotupa K.P.: 1995. Stabilisation of rampant caries: polyol gums and arrest of dentine caries in two long-term cohort studies in young subjects. *Int Dent J.* 45. 93–107.
165. Manchester L.C., Poeggeler B., Alvares F.L., Ogden G.B., Reiter R.J.: 1995. Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic procaryote *Rhodospirillum rubrum*: Implications for an ancient antioxidant system. *Cellar and Molecular Biology Research* 41: 321-5.
166. Marrs K. A., Alfenito M. R., Lloyd A. M., and Walbot V.: 1995. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature*. 375. 397-400.
167. Marsh P., Martin M.V.: 1999. *Oral Microbiology*. 4th edn. Oxford: Wright.
168. Marsh P.D. - Bradshaw D.J.: 1995 Dental plaque as a biofilm. *J. Ind. Microbiol.* 15. 169–175.
169. Marsh P.D. - Bradshaw D.J.: 1997. Physiological approaches to the control of oral biofilms. *Adv. Dent. Res.* 11. 176–185.

170. Marsh P.D.: 1994. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 8. 263-71.
171. Marsh P.D.: 2003. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 149 279-94.
172. Martín M., Macías M., Escames G., Reiter R.J., Agapito M.T., Ortiz G.G. Acuna-Castroviejo D.: 2000. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J. Pineal Res.* 28: 242–248.
173. Matsui R. - Cvitkovitch D.: 2010. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol.* 5: 403–417.
174. Mayo J.C., Sainz R.M., Antoli I., Herrera F., Martin V., Rodriguez C.: 2002. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci.* 59: 1706–1713.
175. McDougall G. J.; Shpiro F.; Dobson P.; Smith P.; Blake A.; Stewart D.: 2005. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit  $\alpha$ - amylase and R-glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* 53. 2760–2766.
176. Mendez M., Jones D.G., Manetas Y.: 1999. Enhanced UV-B radiation under field conditions increases anthocyanin and reduces the risk of photoinhibition but does not affect growth in the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris*. *New Phytol.* 144. 275–282.
177. Miake Y. - Yanagisawa T.: 2000. Effects of xylitol on remineralization of artificial demineralized enamel. *Jap J Oral Biol.* 42. 580–9.
178. Migliori M.L., Romanowski A., Simonetta S.H., Valdez D., Guido M., Golombek D.A.: 2012. Daily variation in melatonin synthesis and arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Pineal Res.* 53: 38–46.
179. Miller W.D.: 1890. The Micro-Organisms of the Human Mouth: The Local and General Diseases Which are Caused by them. Basel: (Reprinted in English, 1973) *Karger*.
180. Montilla P.L., Vargas J.F., Tunez I.F., Munoz de Agueda M.C., Valdelvira M.E., Cabrera E.S.: 1998. Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: Protective effects of melatonin. *J Pineal Res.* 25: 94–100.

181. Moore G.F., Dunsmore B.C., Jones S.M., Smejkal C.W., Jass J., Stoodley P., Lappin-Scott H.M.: 2000. Microbial detachment from biofilms. In: Allison, D.G., Gilbert, P., Lappin-Scott, H.M. & Wilson, M. (eds), *Community Structure and Co-operation in Biofilms*. Cambridge University Press.
182. Mori K.; Sugaya S.; Gemma H.: 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Sci. Hort.* 105. 319-330.
183. Morishita Y., Iinuma Y., Nakashima N., Majima K., Mizuguchi K., Kawamura Y.: 2000. Total and Pancreatic Amylase Measured with 2-Chloro-4-nitrophenyl-4-O- $\beta$ -d-galactopyranosylmaltoside. *Clin. Chem.* 46. 7: 928-933.
184. Moskaug J.O., Carlsen H., Myhrstad M.C.W., Blomhoff R.: 2005. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr.* 81: 277–83.
185. Motilva V., García-Mauriño S., Talero E., Illanes M.: 2011. New paradigms in chronic intestinal inflammation and colon cancer: role of melatonin. *J Pineal Res.* 51: 44–60.
186. Mozetic B., Trebse P., Hribar J. 2002. Determination and Quantitation of Anthocyanins and Hydroxycinnamic Acids in Different Cultivars of Sweet Cherries (*Prunus avium* L.) from Nova Gorica Region (Slovenia) *Food Technol. Biotechnol.* 40. 207–212
187. Mozetic B. - Trebse P.: 2014. Identification of sweet cherry anthocyanins and hydroxy cinnamic acid using HPLC coupled with DAD and MS detector. *Acta Chimica Slovaka.* 51. 151–158.
188. Mulabagal V., Lang G.A., Dewitt D.L, Dalavoy S.S., and Nair M.G.: 2009. Anthocyanin Content, Lipid Peroxidation and Cyclooxygenase Enzyme Inhibitory Activities of Sweet and Sour Cherries *J. Agric. Food Chem.* 57. 1239–1246.
189. Mulabagal V., Van Nocker S., Dewitt D.L, and Nair M.G.: 2007. Cultivars of Apple Fruits That Are Not Marketed with Potential for Anthocyanin Production. *J. Agric. Food Chem.* 55. 8165–8169.
190. Mundy J., Hejgaard J., Svendsen I.: 1984. Characterization of a bifunctional wheat inhibitor of endogenous h-amylase and subtilisin. *FEBS Letters* 167. 2: 210-214.

191. Murray J.R. - Hackett W.P.: 1991. Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L. *Plant Physiol.* 97. 343–351.
192. Muselík J., García-Alonso M., Martín-López M.P., Žemlička M., and Rivas-Gonzalo J.C.: 2007. Measurement of antioxidant activity of wine catechins, procyanidins, anthocyanins and pyranoanthocyanins. *International Journal of Molecular Science.* 8. 8: 797–809.
193. Myhrstad M.C.W., Carlsen H., Nordstrom O., Blomhoff R., Moskaug J.O.: 2002. Flavonoids increase the cellular glutathione level by transactivation of the g-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med.* 32: 386–93.
194. Nemes A., Szöllősi E., Stündl L., Biró A., Homoki J.R., Szarvas M.M., Balogh P., Cziáky Z., Remenyik J.: 2018. Determination of Flavonoid and Proanthocyanidin Profile of Hungarian Sour Cherry. *Molecules.* 23. 3278. doi:10.3390/molecules23123278.
195. Newbrun, E.: 1989. Cariology. 3rd edition, Chicago. *Quintessence Publishing Co*
196. Nizamutdinova I.T., Jin Y.C., Chung J.I., Shin S.C., Lee S.J., Seo H.G., Lee J.H., Chang K.C., Kim H.J.: 2009. The anti-diabetic effect of anthocyanins in streptozotocin-induced diabetic rats through glucose transporter 4 regulation and prevention of insulin resistance and pancreatic apoptosis. *Mol Nutr Food Res.* 53.11: 1419-29. doi: 10.1002/mnfr.200800526.
197. Noda Y., Mori A., Liburdy R., Packer L.: 1999. Melatonin and it's precursors scavenge nitric oxide. *J. Pineal Res.* 27: 159-163.
198. Numao S., Maurus R., Sidhu G., Wang Y., Overall C.M., Brayer G.D., Withers S.G.: 2008. Probing the role of the chloride ion in the mechanism of human pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Biochemistry.* 41: 215-225.
199. Nyárasdy Ida, Bánóczy Jolán: 2009. Preventív fogászat. Budapest.
200. Nyéki J., Soltész M., Popovics L., Szabó T., Thurzó S., Holb I., Fári M.G., Veres Zs., Harsányi G., Szabó Z.: 2005. Strategy of the sour 112 cherry verticum in the Northern Great Plain Region of Hungary. *International Journal of Horticultural Science.* 11. 4: 7-31.
201. Ojeda D., Jiménez-Ferrer E., Zamilpa A., Herrera-Arellano A., Tortoriello J., Alvarez L.: 2010. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by

- the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa* *Journal of Ethnopharmacology* 127: 7–10
202. Olden E. J. - Nybom N.: 1968. On the origin of the *Prunus cerasus* L. *Hereditas*. 59. 327-345.
  203. Ozturk G., Akbulut K.G., Guney S., Castroviejo D-A.: 2012. Age-related changes in the rat brain mitochondrial antioxidative enzyme ratios: Modulation by melatonin. *Exp Gerontol*. 47: 706–711.
  204. Pablos M.I., Reiter R.J., Ortiz G.G., Guerrero J.M., Agapito M.T., Chuang J.I., Sewerynek E.: 1998. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem Int*. 32: 69–75.
  205. Paolucci F., Clavies M.C., Donat F., Necciari J.: 2002. Fondaparinux Sodium Mechanism of Action. *Clinical Pharmacokinetics*. 41: 11-18.
  206. Park J.S.; Choung M.G.; Kim J.B.; Hahn B.S.; Bae S.C.; Roh K.H.; Kim Y.H.; Cheon C.I.; Sung M.K.; Cho K.J.: 2007. Genes up-regulated during red coloration in UV-B irradiated lettuce leaves. *Plant Cell Rep*. 26. 507-516.
  207. Park S., Lee D.E., Jang H., Byeon Y., Kim Y.S., Back K.: 2013. Melatonin-rich transgenic rice plants exhibit resistance to herbicide-induced oxidative stress. *J Pineal Res*. doi: 10.1111/j.1600-079X.2012. 01029.x. [Epub ahead of print].
  208. Pettigrew W.T. - Vaughn K.C.: 1998. Physiological, structural, and immunological characterization of leaf and chloroplast development in cotton. *Protoplasma*. 202. 23–37.
  209. Piccolella S., Fiorentino A., Pacifico S., D’abrosca B., Uzzo P., and Monaco P.: 2008. Antioxidant Properties of Sour Cherries (*Prunus cerasus* L.): Role of Colorless Phytochemicals from the Methanolic Extract of Ripe Fruits *J. Agric. Food Chem*. 56. 1928–1935.
  210. Pinhero R.G., Rao M.V., Paliyath G., Murr D.P., Fletcher R.A.: 1997. Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol- induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol*. 114. 695–704.
  211. Pitts N.B.: 2004. Are we ready to move from operative to non-operative/preventive treatment of dental caries in clinical practice? *Caries Res*. 38: 294–304.

212. Poeggeler B., - Hardeland R.: 1994. Detection and quantification of melatonin in a dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*: solutions to the problem of methoxyindole destruction in non-vertebrate material. *J Pineal Res.* 1. 7: 1 -10.
213. Poeggeler B., Reiter R.J., Tan D.X., Chen L.D., Manchester L.C.: 1993. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: A hypothesis. *J Pineal Res.* 14: 151-168.
214. Popov I.N. - Lewin G.: 1996. Photochemiluminescent detection of antiradical activity: IV. Testing of lipid-soluble antioxidants. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods.* 31. 1–8.
215. Proctor G.B., Carpenter G.H.: 2007. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Autonomic Neuroscience. Basic and Clinical.* 133. 3–18.
216. Prodan A., Brand H.S., Ligtenberg A.J.M., Imangaliyev S., Tsivtsivadze E., Van Derweijden G.A., Crielaard W., Keijser B.J.F., Veerman E.C.I.: 2015. Inter-individual variation, correlations, and sex-related differences in the salivary biochemistry of young healthy adults. *Eur. J. Oral Sci.* 123. 149–157.
217. Ramasubbu N., Ragunath C., Mishra P.J.: 2003. Probing the role of a mobile loop in substrate binding and enzyme activity of human salivary amylase. *J. Mol. Biol.* **325**. 1061- 1076.
218. Reddy A.R., Britsch L., Salamini F., Saedler H., and Rohde W.: 1987. The A1 (anthocyanin-1) locus in *Zea mays* encodes dihydroquercetin reductase. *Plant Sci.* 52. 7-13.
219. Reiter R.J. - Tan D.X.: 2002. Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957. 341–344.
220. Reiter R.J., Manchester L.C., Tan D.X.: 2005. Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition.* 21. 920-924.
221. Reiter R.J., Tan D.X., Burkhardt S., Manchester L.C.: 2001. Melatonin in Plants *Special Article* 286-290.
222. Reiter R.J., Tan D.X., Galano A.: 2014. Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. *Frontiers in physiology.* 5. 377: 1-4.doi: 10.3389/fphys.2014.00377
223. Reiter R.J., Tan D.X., Sainz R.M., Mayo J.C., Lopez-Burillo S.: 2002. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 54: 1299–1321.

224. Reiter R.J., Tan D.X., Terron M.P., Flores L.J., Czarnocki Z.: 2007. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol.* 54. 1: 1-9p.
225. Ribelles L. M., Guinot J.F., Mayne A. R., Bellet D.L.J.: 2010. Effects of xylitol chewing gum on salivary flow rate, pH, buffering capacity and presence of *Streptococcus mutans* in saliva. *European Journal of Paediatric Dentistry* 11. 1: 9-14.
226. Rizhsky L., Liang H.J., Mittler R.: 2003. The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. *J. Biol. Chem.* 278. 38921–38925.
227. Rohleder N. - Nater U.M.: 2009. Determinants of salivary  $\alpha$ -amylase in humans and methodological considerations. *Psychoneuroendocrinology*. 34. 469–485.
228. Roitsch T.: 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2. 198–206.
229. Rosan B. - Lamont R.J.: 2000. Dental plaque formation. *Microbes Infect.* 2. 1599–1607.
230. Roy M., Sen S., Chakraborti A.S.: 2008. Action of pelargonidin on hyperglycemia and oxidative damage in diabetic rats: Implication for glycation-induced hemoglobin modification. *Life Sciences*. 82. 1102–1110.
231. Russell R.R.: 2008. How has genomics altered our view of caries microbiology? *Caries Res.* 42: 319–327.
232. Salisbury F.R. - Ross C.W.: 1992. *Plant physiology*, 4th edn. Wadsworth, Belmont
233. Sano H., Shibasaki K., Matsukubo T., Takaesu Y.: 2003. Effect of chitosan rinsing on reduction of dental plaque formation. *Bull Tokyo Dent Coll.* 44. 1: 9–16.
234. Saracino A., D'Alessandro C.M., Borghetti M.: 2004. Seed colour and post-fire bird predation in a Mediterranean pine forest. *Acta Oecol.* 26. 191–196.
235. Saracino A., Pacella R., Leone V., Borghetti M.: 1997. Seed dispersal and changing seed characteristics in a *Pinus halepensis* Mill. forest after fire. *Plant Ecol.* 130. 13–19.
236. Saslowsky D. - Winkel-Shirley B.: 2001. Localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* 27. 37-48.

237. Scannapieco F.A., Bergey E.J., Reddy M.S., Levine M.J.: 1989. Characterization of salivary alpha-amylase binding to *Streptococcus sanguis*. *Infect. Immun.* 57. 2853-2863.
238. Scannapieco F.A., Bhandary K., Ramashubbu N., Levine M.J.: 1990. Structural relationship between the enzymatic and streptococcal binding sites of human salivary  $\alpha$ -amylase. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 173. 1109-1115.
239. Scannapieco F.A., Torres G., Levine M.J.: 1993. Salivary  $\alpha$ -Amylase: Role in Dental Plaque and Caries Formation. *Crit. Rev. Oral Biol. M.* 4. 301-307.
240. Scannapieco F.A., Torres G., Levine M.J.: 1995. Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *J. Dent. Res.* 74. 1360- 1366).
241. Scebbba F., Sebastiani L., Vitagliano C.: 1999. Protective enzymes against activated oxygen species in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings: responses to cold acclimation. *J. Plant Physiol.* 155. 762–768.
242. Schaefer H.M., Rolshausen G.: 2006. Plants on red alert: do insects pay attention? *BioEssays* 28. 65–71.
243. Scheinin A. - Mäkinen K.K.: (1975). Turku sugar studies I-XXI. *Acta Odontol Scand.* 33. 70. 1–349.
244. Seymour E.M., Singer A.A.M., Kirakosyan A., Urcuyo-Llanes D: E., Kaufman P.B., Bolling S.F.: 2008. Altered Hyperlipidemia, Hepatic Steatosis, and Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Rats with Intake of Tart Cherry. *J Med Food* 11. 2: 252–259. DOI: 10.1089/jmf.2007.658
245. Seymour E.M., Lewis S.K., Urcuyo-Llanes D.E., Tanone I.I., Kirakosyan A., Kaufman P.B., and Bolling S.F.: 2009. Regular Tart Cherry Intake Alters Abdominal Adiposity, Adipose Gene Transcription, and Inflammation in Obesity-Prone Rats Fed a High Fat Diet *J Med Food* 12. 5: 935–942 DOI: 10.1089=jmf.2008.0270
246. Shibasaki k., Sano H., Matsukubo T., Takaesu Y.: 1994. pH response of human dental plaque to chewing gum supplemented with low molecular chitosan. *Bull Tokyo Dent Coll.* 35. 2: 61–6.
247. Shih P.H., Yeh C.T., Yen G.C.: 2007. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J Agric Food Chem.* 55: 9427–9435.

248. Silva M. M., Santos M. R., Caroco G., Rocha R., Justino G., Mira L.: 2002. Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids: A Re-examination. *Free Radical Research*. 36. 11: 1219-1227.
249. Singh A., Selvi M., Sharma R.: 1999. Sunlight-induced anthocyanin pigmentation in maize vegetative tissues. *J. Exp. Bot.* 50. 1619–1625.
250. Singh S., Sharma A., Sood P.B., Sood A., Zaidi I. Sinha A.: 2015. Saliva as a prediction tool for dental caries: An in vivo study. *J. Oral Biol. Craniofac. Res.* 5. 59–64.
251. Skinner A. - Woods A.: 1984. An investigation of the effects of malt- ose and sucrose in the diet on the microbiology of dental plaque in Man. *Arch Oral Biol.* 29: 323–326.
252. Smith A. P., Chaplalin K., Wadsworth E.: 2012. Chewing gum occupational stress, work performance and wellbeing. An intervention study. *Appetite*. 58. 1083-1086.
253. Smullen J., Koutsou G., Foster H., Zumbé A., Storey, D.: 2007. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 41. 342–349.
254. Solfanelli C., Poggi A., Loreii E., Alpi A., Perata P.: 2006. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 140. 637–646.
255. Song N., Kim A.J., Kim H.J., Jee H.J., Kim M., Yoo Y.H., Yun J.: 2012. Melatonin suppresses doxorubicin-induced premature senescence of A549 lung cancer cells by ameliorating mitochondrial dysfunction. *J Pineal Res.* 53. 4: 335–343.
256. Springob K.; Nakajima J.; Yamazaki M.; Saito K.: 2003. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat. Prod. Rep.* 20. 288-303.
257. Stauder M., Papetti A., Mascherpa D., Schito A.M., Gazzani G. Pruzzo C., Daglia M.: 2010. Antiadhesionand antibiofilm activities of high molecular weight coffee components against *Streptococcus mutans*. *J. Agric. Food Chem.* 5. 11662–11666.
258. Steffen Y., Gruber C., Schewe T., Sies H.: 2008. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys.* 469: 209–19.

259. Stehle J.H., Saade A., Rawashdeh O., Achermann K., Jilg A., Sebestény T., Maronde E.: 2011. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J Pineal Res.* 51:17–43.
260. Steinberg I.M., Odusola F., Mandel I.D.: 1992. Remineralizing potential, anti-plaque and antigingivitis effects of xylitol and sorbitol sweetened chewing gum. *Clin Prev Dent.* 14. 31–4.
261. Steyn W.J., Wand S.J.E., Holcroft D.M., Jacobs G.: 2002. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytol.* 155. 349–361.
262. Suganami T., Nishida J., Ogawa Y.: 2005. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25: 2062–8.
263. Szentágothai J. - Réthelyi M.: 1997. Funkcionális anatómia II. Semmelweis Kiadó, Budapest. 1136.
264. Tadera K., Minami Y., Takamatsu K., Matsuoka T.: 2006. Inhibition of  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase by Flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol.* 52. 149–153.
265. Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J., Plummer B.F.: 1999. Cyclic 3-Hydroxymelatonin: A Melatonin Metabolite Generated as a Result of Hydroxyl Radical Scavenging. *Biol Signals Recept.* 8: 70–74.
266. Tan D.X., Hardeland R., Manchester L.C., Korkmaz A., Ma S., Rosales-Corral S., Reiter R.J.: 2012. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *J Exp Bot.* 63: 577–597.
267. Tan D.X., Hardeland R., Manchester L.C., Paredes S.D., Korkmaz A., Sainz R.M., Mayo J.C., Fuentes-Broto L., Reiter R.J.: 2010. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 85: 607–623.
268. Tan D.X., Manchester L.C., Liu X., Rosales-Corral S.A., Acuna-Castroviejo D., Reiter R.J.: 2013. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *Journal of Pineal Research* 54: 127–138.

269. Tan D.X., Manchester L.C., Terron M.P., FLORES L.J., Reiter R. J.: 2007 One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and reactive nitrogen species? *Journal of Pineal Research* 42. 28–42.
270. Tanaka Y., Matsuoka M., Yamanoto N., Ohashi Y., Kano-Murakami Y., Ozeki Y.: 1989. Structure and characterization of a cDNA clone for phenylalanine ammonia-lyase from cut-injured roots of sweet potato. *Plant physiol.* 90. 1403–1407.
271. Tarsi R., Muzzarelli R.A., Guzman C.A., Pruzzo C.: 1997. Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. *J Dent Res.* 76. 2: 665–72.
272. Thimothe J., Bonsi I.A., Padilla-Zakour O.I., Koo H.: 2007. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis interspecific hybrids*) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *J. Agric. Food Chem.* 55. 10200–10207.
273. Timberlake C. F. - Bridle P.: 1976 Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture.* 27. 3: 97–105.
274. Toeller M.: 1994.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors in diabetes: efficacy in NIDDM subjects. *European Journal of Clinical Investigation* 24. 31–35.
275. Tomás-Zapico C. - Coto-Montes A.: 2005. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J. Pineal Res.* 39: 99–104.
276. Toufektsian M.C., de Lorgeril M., Nagy N., Salen P., Donati M.B., Giordano L., Mock H.P., Peterek S., Matros A., Petroni K., Pili R., Rotilio D., Tonelli C., de Leiris J., Boucher F., Martin C.: 2008. Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. *Journal of Nutrition.* 138. 4: 747–752.
277. Touger-Decker R., van Loveren C.: 2003. Sugars and dental caries. *Am J Clin Nutr.* 78: S881–92.
278. Toydemir G., Capanoglu E., Gomez Roldan M.V., de Vos R.C.H., Boyacioglu D., Hall R.D., Beekwilder M.J.: 2013. Industrial processing effects on phenolic compounds in sour cherry (*Prunus cerasus* L.) fruit. *Food Research International.* 53. 218–225.

279. Tsuda T.: 2008. Regulation of Adipocyte Function by Anthocyanins; Possibility of Preventing the Metabolic Syndrome *J. Agric. Food Chem.* 56. 642–646.
280. Turner M.K.: 2009. Anthocyanins increase antioxidant enzyme activity in HT-29 adenocarcinoma cells. MSc thesis Atheus, Georgia USA.
281. Urata Y., Honma S., Goto S., Todoroki S., Iida T., Cho S., Honma K., Kondo T.: 1999. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 838-847.
282. Vacca-Smith A.M, Venkitaraman A.R., Quirey R.G. Jr., Bowen W.H.: 1996. Interactions of streptococcal glucosyltransferases with  $\alpha$ -amylase and starch on the surface of saliva-coated hydroxyapatite. *Archs. Oral Biol.* 41. 291-298.
283. Valduga E., Lazzari M.R., Xardanega R., Di Luccio M.: 2012. Evaluation of sugar inversion in chewing gum added of sodium lactate. *Journal of Food Process Engineering.* 35. 37-53.
284. Vallee B.L., Stein E.A., Sumerwell W.N., Fischer E.H.: 1959. Metal content of  $\alpha$ -amylases of various origins. *Journal of Biological Chemistry.* 234: 2901-2905.
285. Virga C., Beltramo D., Landa C., Passalacqua N., Dorronsoro S.: 2002. A comparative study *in vivo* of the therapeutic effect of triclosan, hexetidine and chitosan. *Acta Odontol Latinoam.* 15. 1–2: 3–9.
286. Wang H., Nair M.G., Iezzoni A.F., Strasburg G.M., Booren A.M., and Gray J.I.: 1997. Quantification and Characterization of Anthocyanins in Balaton Tart Cherries *J. Agric. Food Chem.* 45. 2556–2560.
287. Wang H., Nair M.G., Strasburg G.M., Chang Y.C., Booren A.M., Gray J.I., DeWitt D.L.: 1999. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *Journal of Natural Products.* 62. 2: 294–296.
288. Wang P., Yin L., Liang D., Li C., Ma F., Yue Z.: 2012. Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate-glutathione cycle. *J Pineal Res.* 53: 11–20.
289. Wang Y., Chung F.F., Lee S.M., Dykes G.A.: 2013. Inhibition of attachment of oral bacteria to immortalized human gingival fibroblasts (HGF-1) by tea extracts and tea components. *BMC Res.* 6. 143: 2-5.

290. Wedick N.M., Pan A., Cassidy A., Rimm E.B., Sampson L., Rosner B., Willett W., Hu F.B., Sun Q., van Dam R.M.: 2012. Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *Am J Clin Nutr.* 95: 925–33.
291. Wessel S. W., Chen Y., Maitra A., van den Heuvel E.R., Slomp A.M., Busscher H.J. van der Mei H.C.: 2014. Adhesion Forces and Composition of Planktonic and Adhering Oral Microbiomes. *J. Dent. Res.* 93. 1: 84–88.
292. Wheldale M.: 1916. The Anthocyanin Pigments of Plants. Cambridge University Press, Cambridge.
293. Whittaker C.J., Klier C.M., Kolenbrander P.E. 1996. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 50. 513–552.
294. Williamson G.B.: 1982. Plant mimicry: evolutionary constraints. *Biol. J. Linn. Soc.* 18. 49–58.
295. Wilson M., Reddi K., Henderson B.: 1996. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J. Periodont. Res.* 31. 393–407.
296. Wilson M.: 2001. Bacterial biofilms and human disease. *Science Progress.* 84. 3: 235–254.
297. Winkler B.S., Orselli S.M., Rex T.S: 1994. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. *Free Radical Biology and Medicine* 17. 4: 333-349.
298. Winn D.M.: 2001. Tobacco use and oral disease. *J Dent Educ.* 65: 306–12.
299. Wise R.R.: 1995. Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynth. Res.* 45. 79–97.
300. Wolber G. - Langer T.: 2005. LigandScout3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *Journal of Chemical Information and Modeling.* 45. 1: 160–169.
301. Wolber G., Dornhofer A.A., Langer T.: 2006. Efficient overlay of small organic molecules using 3D pharmacophores. *Journal of Computer-Aided Molecular Design.* 20. 12: 773–788.
302. Wolber G., Seidel T., Bendix F. - Langer T.: 2008. Molecule-pharmacophore superpositioning and pattern matching in computational drug design. *Drug Discovery Today.* 13. 1–2: 23–29.

303. Wolff L., Liljemmark W.F.: 1978. Observation of beta-hemolysis among three strains of *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*. 19. 2: 745-748.
304. Xu J.W.: Ikeda K., Yamori Y.: 2004. Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Cyanidin-3-Glucoside, a Typical Anthocyanin Pigment. *J. of American Heart Association*. 44: 217-222. DOI: 10.1161/01.HYP.0000135868.38343.c6
305. Yamagata H., Kunimatsu K., Kamasaka H., Kuramoto T., Iwasaki T.: 1998. Rice bifunction a-amylase/subtilisin inhibitor: Characterization, localization, and changes in developing and germinating seeds. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 62. 5: 978-985.
306. Yamanaka A., Kimizuka R., Kato T., Okuda K.: 2004. Inhibitory effects of cranberry juice on attachment of oral streptococci and biofilm formation. *Oral Microbiol. Immunol.* 19. 150–154.
307. Yamane T.; Seok T.J.; Goto-Yamamoto N.; Koshita Y.; Kobayashi S.: 2006. Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins. *Amer. J. Enol. Viticult.* 57. 54-59.
308. Yang X., Wang G., Zhang X.: 2004. Release kinetics of catechins from chewing gum. *Journal of Pharmaceutical Science*. 93. 2: 293-299.
309. Yao Y., Grogan J., Zehnder M., Lendenmann U., Nam B., Wu Z., Costello C.E., Oppenheim F. G.: 2001. Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. *Arch. oral Biol.* 46. 293-303.
310. Youdim, K. A., Martin, A., & Joseph, J. A. (2000). Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(1), 51–60.
311. Yu H.S. - Reiter R.J.: 1993. Melatonin: biosynthesis, physiological effects and clinical applications. CRC Press, Boca Raton
312. Zhang N., Zhao B., Zhang H.J., Weeda S., Yang C., Yang Z.C., Ren S., Guo Y.D.: 2013. Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J Pineal Res.* 54. 1: 15-23. doi: 10.1111/j.1600-079X.2012.01015.x. [Epub ahead of print].
313. Zheng Y.; Tian L.; Liu H.; Pan Q.; Zhan J.; Huang W.: 2009. Sugars induce anthocyanin accumulation and flavanone 3-hydroxylase expression in grape berries. *Plant Growth Regul.* 58. 251-260.

314. Zhou W., Zhang X., Zhu C.L., He Z.Y., Liang J.P., Song Z.C.: 2016. Melatonin Receptor Agonists as the “Perioceutics” Agents for Periodontal Disease through Modulation of *Porphyromonas gingivalis* Virulence and Inflammatory Response. *PLOS ONE* 1-20. DOI:10.1371/journal.pone.0166442
315. Ziegler D.: 2005. Type 2 Diabetes As An Inflammatory Cardiovascular Disorder. *Current Molecular Medicine*. 5. 3: 309-322.

## 12. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/277/2019.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Homoki Judit  
Neptun kód: JUDIT  
Doktori Iskola: Kerpely Kálmán Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10051569

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

#### Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (2)

1. **Homoki, J.**, Gyémánt, G., Gálné Remenyik, J.: Régi hormon új csodája: magyarországi meggyfajták mint természetes melatonin források.  
*Agrártud. Közl.* 63, 65-72, 2015. ISSN: 1587-1282.
2. **Homoki, J.**, Nemes, A., Gálné Remenyik, J.: A meggy mint funkcionális élelmiszer.  
*Agrártud. Közl.* 55, 41-47, 2014. ISSN: 1587-1282.

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

3. **Homoki, J.**, Gyémánt, G., Balogh, P., Stündl, L., Bíró Molnár, P., Paholcsék, M., Váradi, J., Fenyvesi, F., Kelentey, B., Nemes, J., Gálné Remenyik, J.: Sour cherry extract inhibits human salivary  $\alpha$ -amylase and growth of *Streptococcus mutans*: (a pilot clinical study).  
*Food Funct.* 9 (7), 4008-4016, 2018. ISSN: 2042-6496.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C8FO00064F>  
IF: 3.289 (2017)
4. **Homoki, J.**, Nemes, A., Fazekas, E., Gyémánt, G., Balogh, P., Gál, F., Al, A. J., Mortier, J., Wolber, G., Babinszky, L., Gálné Remenyik, J.: Anthocyanin composition, antioxidant efficiency, and alpha-amylase inhibitor activity of different Hungarian sour cherry varieties (*Prunus cerasus* L.).  
*Food Chem.* 194 (1), 222-229, 2016. ISSN: 0308-8146.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.130>  
IF: 4.529

#### Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (2)

5. **Homoki, J.**, Nemes, A., Hüse, C., Fári, M., Gálné Remenyik, J.: A cyanidin-3-O monoglükózid felhalmozódása a magyarországi meggy fajtákban.  
In: XVII. Növénynevelési Tudományos Napok. Összefoglalók: Növényneveléssel kultúrnövényeink sokféleségeért. Szerk.: Óvári Judit, Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft., Szeged, 68, 2011. ISBN: 978963081235





6. **Homoki, J.**, Fári, M., Gálné Remenyik, J.: Magyar meggyfajták antocianin profiljainak összehasonlító elemzése.  
In: XVI. Növénynevelési Tudományos Napok : összefoglalók. Szerk.: Veisz Ottó, MTA Agrártudományok Osztályának Növénynevelési Bizottsága, Budapest, 77, 2010.

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (1)

7. **Homoki, J.**, Gyémánt, G., Balogh, P., Stündl, L., Bíró, P., Szarvas, M. M., Váradi, J., Fenyvesi, F., Kelentey, B., Nemes, J., Gálné Remenyik, J.: Anti-caries bubble gum.  
In: 9th Central European Congress on Food, Food Science for Well-being : Abstract book.  
Ed.: L. Gaceu, M. Mironescu, G. Mohan, Lucia Blaga University of Sibiu Press, Sibiu, Romania, 143, 2018. ISBN: 9786061215461

**További közlemények**

Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

8. Bódi, É., Gálné Remenyik, J., Nemes, A., **Homoki, J.**, Peles, F., Fekete, I., Kovács, B.: Szelénnel dúsított étkezési csírák antioxidáns aktivitásának meghatározása, valamint mikrobiológiai vizsgálataik.  
*Agrártud. Közl.* 52, 25-30, 2013. ISSN: 1587-1282.

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

9. Nemes, A., Szöllősi, E., Stündl, L., Bíró, A., **Homoki, J.**, Szarvas, M. M., Balogh, P., Cziáky, Z., Gálné Remenyik, J.: Determination of Flavonoid and Proanthocyanidin Profile of Hungarian Sour Cherry.  
*Molecules.* 23 (12), 1-20, 2018. ISSN: 1420-3049.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23123278>  
IF: 3.098 (2017)
10. Nguyen, T. L. P., Fenyvesi, F., Gálné Remenyik, J., **Homoki, J.**, Gogolák, P., Bácskay, I., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Vasvári, G., Vecsernyés, M., Váradi, J.: Protective Effect of Pure Sour Cherry Anthocyanin Extract on Cytokine-Induced Inflammatory Caco-2 Monolayers.  
*Nutrients.* 10 (7), 1-14, 2018. EISSN: 2072-6643.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/nu10070861>  
IF: 4.196 (2017)
11. Bódi, É., Gálné Remenyik, J., Nemes, A., **Homoki, J.**, Peles, F., Fekete, I., Kovács, B.: The determination of antioxidant activity of selenium-enriched wheat and pea sprouts, as well as their microbiological analysis.  
*Scientific papers. Series A., Agronomy.* 56., 196-201, 2013. ISSN: 2285-5785.





Magyar nyelvű konferencia közlemények (1)

12. Bódi, É., Gálné Remenyik, J., Nemes, A., **Homoki, J.**, Fekete, I., Kovács, B.: A szelénkezelés és az antioxidáns aktivitás közötti kapcsolat vizsgálata étkezési csírák esetén.  
In: XIX. Ifjúsági Tudományos Fórum, [s.n.], [Keszthely], 1-6, 2013.

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (1)

13. Nemes, A., **Homoki, J.**, Kiss, R., Stündl, L., Gálné Remenyik, J.: Effect of anthocyanin-rich tart cherry extract on blood antioxidant status in a high fat diet induced obesity mouse model.  
In: 9th Central European Congress on Food, Food Science for Well-being : Abstract book.  
Ed.: L. Gaceu, M. Mironescu, G. Mohan, Lucia Blaga University of Sibiu Press, Sibiu, 146, 2018. ISBN: 9786061215461

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,112**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
7,818**

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, 2019.06.25.



### 13. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném megköszönni a témavezetőm: *Dr. Remenyik Judit* tudományos főmunkatársnak, a témavezetői munkáját. Megtanította számomra az analitikai vizsgálatok elméletét és gyakorlatát. Az elmúlt években tanácsaival, támogatásával, iránymutatásaival segítette a munkámat. Kérdéseimmel bátran fordulhattam hozzá, mindig készségesen segített. Hálásan köszönöm, hogy megtanított a pontos, precíz és igényes munkavégzésre. Témavezetőm tudomány iránti alázata és kitartó munkája ösztönző erőként hatott rám. Hálás vagyok a tőle kapott bizalomért és hitért. Bizalomért, melyről kezdetektől fogva biztosított azáltal, hogy bekapcsolódhattam a meggy kutatási munkákba. A hitért, mert nem volt kétsége afelől, hogy a tőle kapott feladatot el tudom végezni. Köszönöm, a türelmét, támogatását, hogy hagyott hibázni és ezen hibákból tanulhattam. Köszönöm az itt töltött éveket.

Köszönettel tartozom *Dr. Gyémánt Gyöngyi* egyetemi docensnek mert erejét nem kímélve elméleti, gyakorlati tanácsával folyamatosan segítette munkámat. Megtanította az enzimológiához kapcsolódó kinetikai méréseket, továbbá infrastruktúrát biztosított számomra ezen kinetikai mérések elvégzéséhez. Hálás köszönetemet szeretném kifejezni a MALDI-TOF MS mérésekért.

Köszönetemet szeretném kifejezni a berlini Freie University, Gyógyszerészeti Intézet, Gyógyszerészeti és Gyógyászati Kémia Tanszékén dolgozó *Dr. Jérémie Mortier* és *Dr. Gerhard Wolber*-nek, hogy *in silico* modellezték az általunk tanulmányozott antocianin struktúrák HSA aktív centrumához való kötődését.

Köszönöm *Dr. Váradi Judit* adjunktusnak, hogy a formulációt elvégezték, a fejlesztett rágógumit elkészítették, és a kutatásainkhoz rendelkezésünkre bocsátották.

Szeretném megköszönni *Dr. Nemes Judit* a Gyermekfogászati és Prevenciók nem önálló Tanszék megbízott tanszékvezetőjének és munkatársainak, valamint *Dr. Kelentey Barna* egyetemi docensnek és munkatársainak a humán kísérlethez kapcsolódó munkájukat.

Köszönöm *Dr. Paholcsek Melinda* tanársegédnek önzetlen szakmai segítségét és hogy a mikrobiológiai mérésekhez szükséges infrastruktúrát a rendelkezésemre bocsátotta. Köszönöm építő kritikáit, szakmai és baráti tanácsait, biztatását és a sok-sok nevetést.

Köszönettel tartozom *Prof. Dr. Balogh Péter* egyetemi tanárnak a méréseinkhez kapcsolódó statisztikai elemzések elvégzéséért és hogy a dolgozatírás során tanácsaival észrevételével folyamatosan segítette munkámat.

Köszönöm Élelmiszertechnológiai Intézet támogatását. Hálával tartozom a *munkacsoport valamennyi tagjának*, akik az elmúlt években az értekezésben megjelenő eredmények elkészüléséhez szakmai segítségükkel közreműködtek. Külön szeretném kiemelni *Bíróné Molnár Piroska* áldozatkész, önzetlen segítségét. Köszönöm PhD hallgató társaimnak, különösképpen *Kun-Nemes Andreának* a segítséget és a támogatást. Köszönöm a volt hallgatóimnak *Asbóth Georginának és Homoki Dávidnak* a méréseikben nyújtott segítségüket és türelmüket, és hogy a kezdeti témavezetői gyengeségeimet elnézték nekem.

Köszönöm *családomnak és barátaimnak* a türelmet, támogatást, segítséget és hogy biztos háttérrel nyújtottak számomra és ezáltal hatékonyan tudtam küzdeni a célomért. Végül hálásan köszönöm a *Társamnak*, hogy elszánt nyugalommal, sok-sok türelemmel és megértéssel viselte az összes bolondságomat.

## 14. MELLÉKLET

1. melléklet: Meggykivonat mikrobiológiai vizsgálat eredménye:

### Mikrobiológiai vizsgálatok eredménye

**Minta megnevezése:** meggy pempő

**Minta mikrobiológiai vizsgálatának eredményei:**

Mezofil aerob mikrobaszám (MSZ EN ISO 4833:2003 szabvány szerint): 0 TKE/g

Élesztő- és penészgombaszám (MSZ ISO 7954 szabvány szerint): 0 TKE/g

**Határértékek:**

4/1998. (XI. 11.) EüM rendelet alapján a **”gyümölcs koncentrátum, szörp”** elnevezésű termékcsoportra vonatkozó **kötelező** vizsgálatok és határértékek.

Mezofil aerob mikrobaszám: m:  $10^1$  TKE/g, M:  $10^3$  TKE/g

Penészgombaszámra nem ad meg határértéket.

4/1998. (XI. 11.) EüM rendelet alapján a belső minőségellenőrzést szolgáló mikrobiológiai vizsgálatok és **ajánlott** határértékek az **”édes- és cukrárszipari termékek”** esetében az alábbiak:

Mezofil aerob mikrobaszám: m:  $10^4$  TKE/g, M:  $10^5$  TKE/g

Penészgombaszám: m:  $10^2$  TKE/g, M:  $10^3$  TKE/g

„m”=megfelelőség határértéke; „M”=visszautasítás határértéke

A minta minősége **megfelelő**, ha a kapott érték az „m” értéket nem éri el.

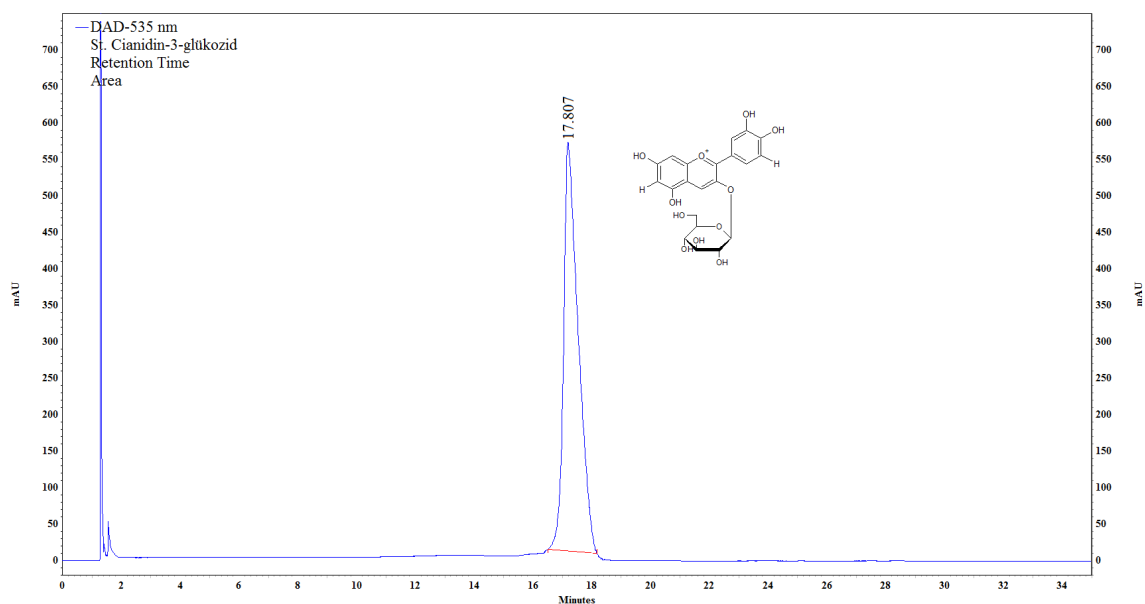
**Tűrhető**, ha eléri, vagy meghaladja az „m” értéket, de az „M” értéket nem éri el.

**Nem megfelelő**, ha az „M” értéket eléri, vagy meghaladja.

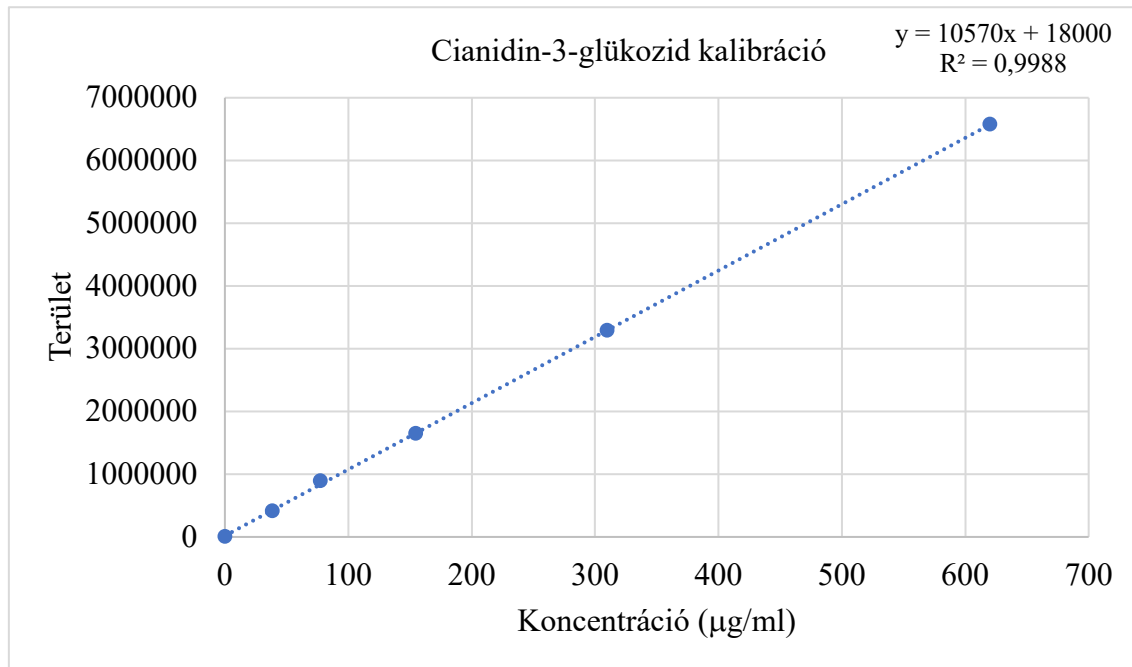
Debrecen, 2014. október 14.

Dr. Peles Ferenc Árpád sk  
DE MÉK ÉTI

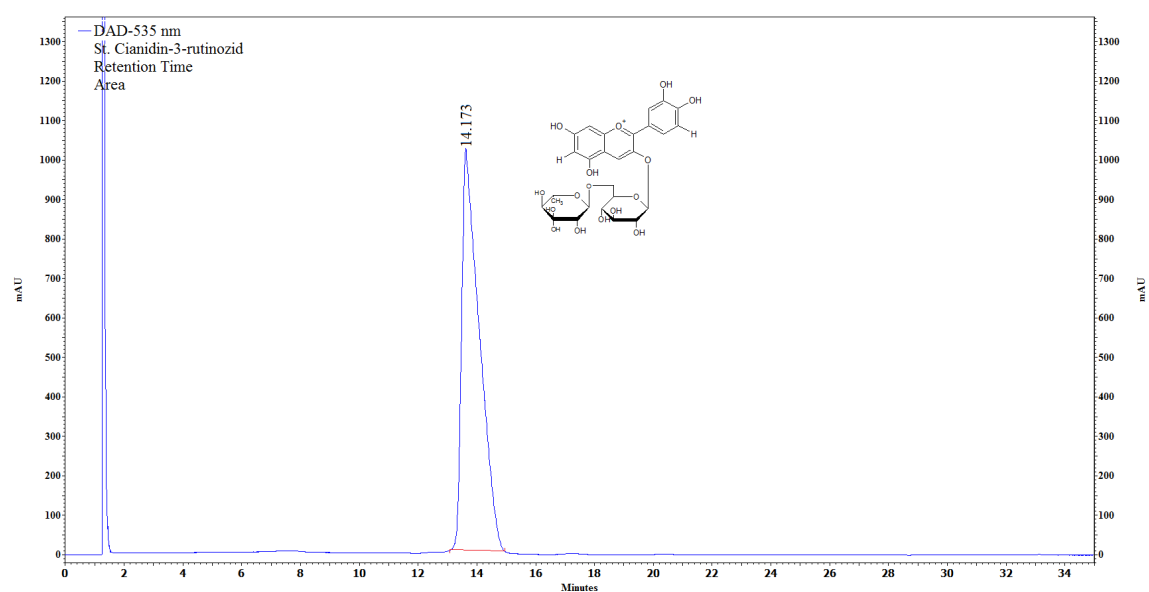
2. melléklet: Cianidin-3-glükózid standard kromatogramja és kalibrációs egyenese.



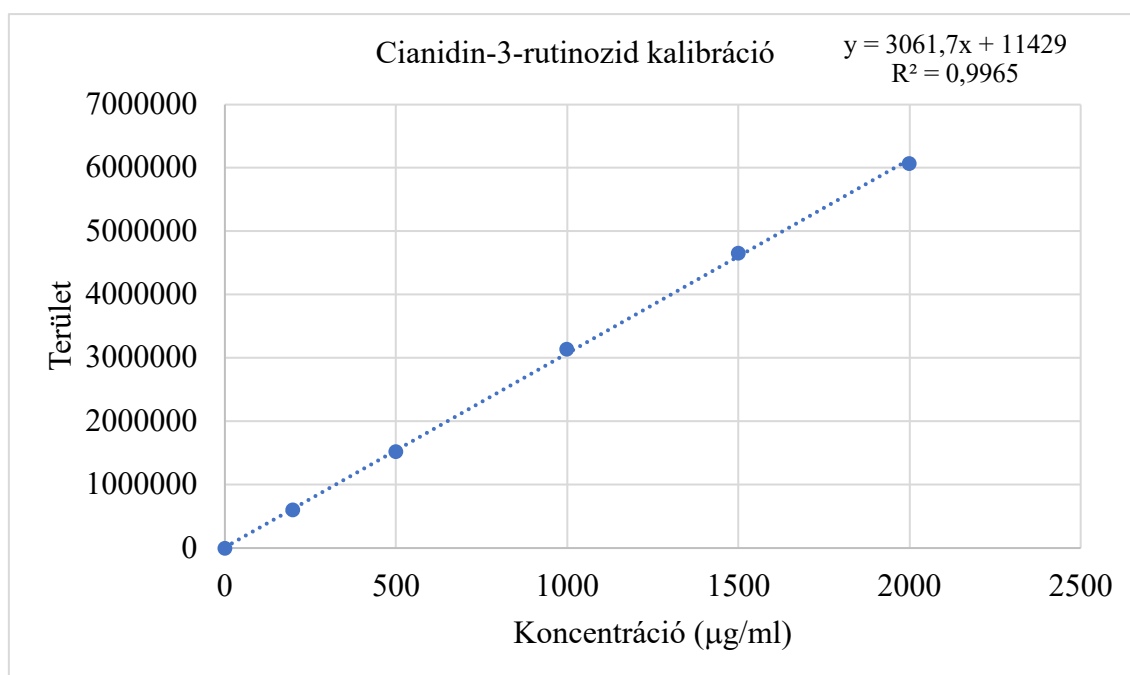
1. ábra: Cianidin -3-glükózid standard kromatogramja



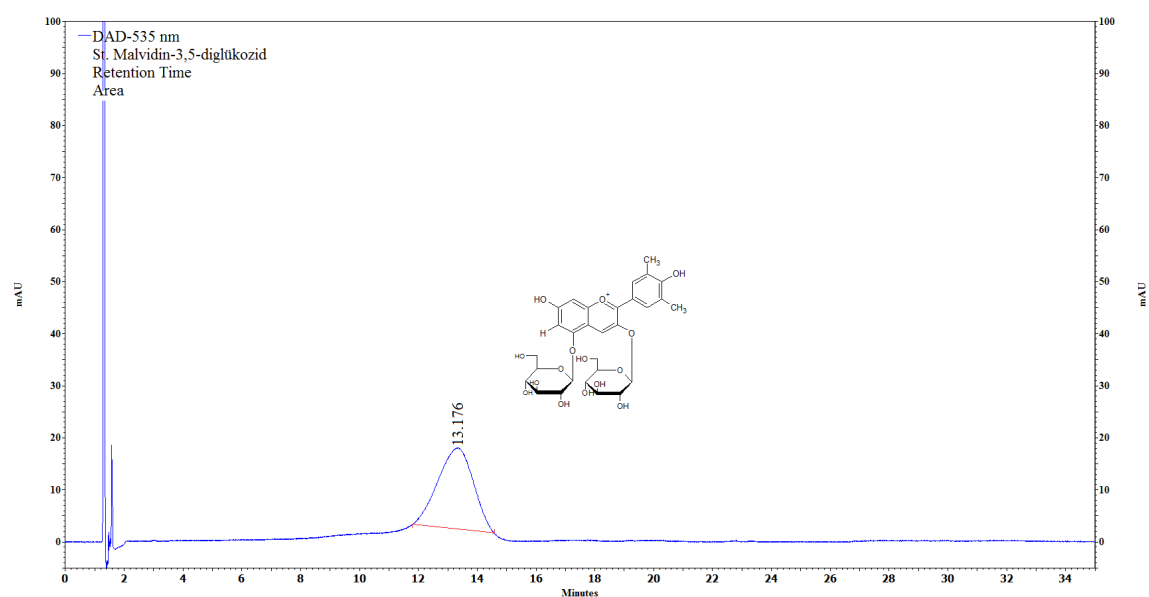
### 3. melléklet: Cianidin-3-rutinozid standard kromatogramja és kalibrációs egyenese



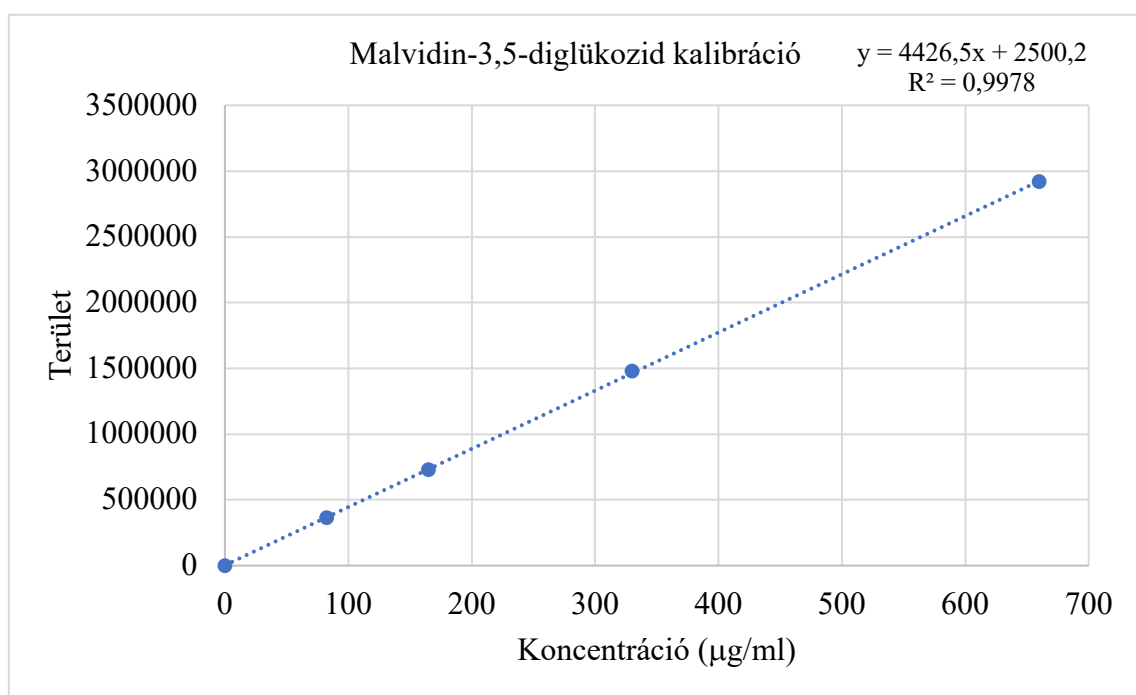
**2. ábra:** Cianidin-3-rutinozid standard kromatogramja



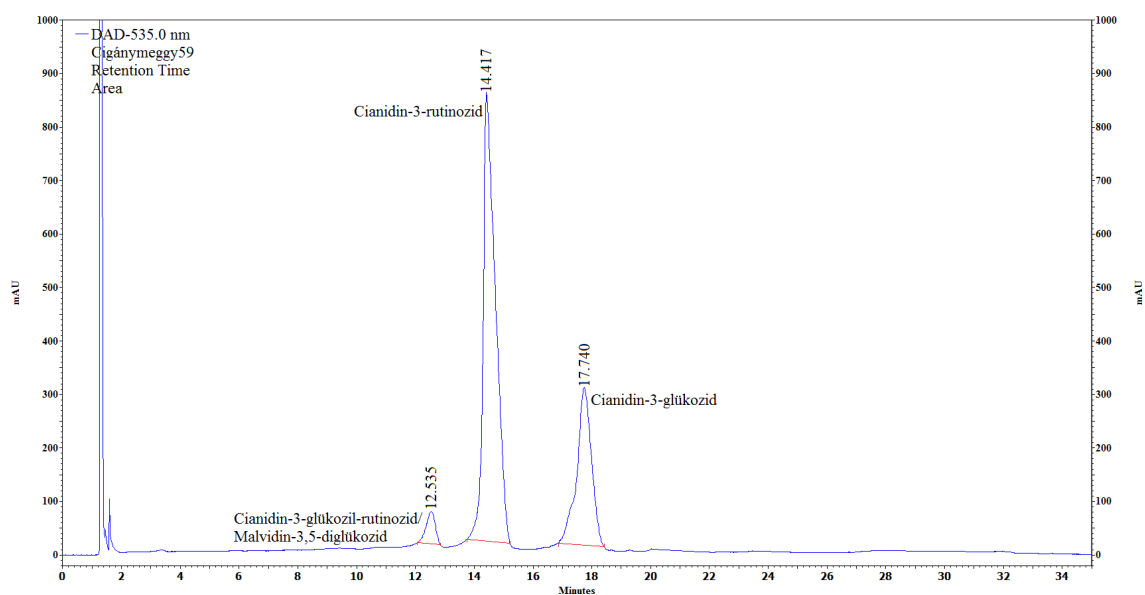
4. melléklet: Malvidin-3,5-diglükózid standard kromatogramja és kalibrációs egyenese.



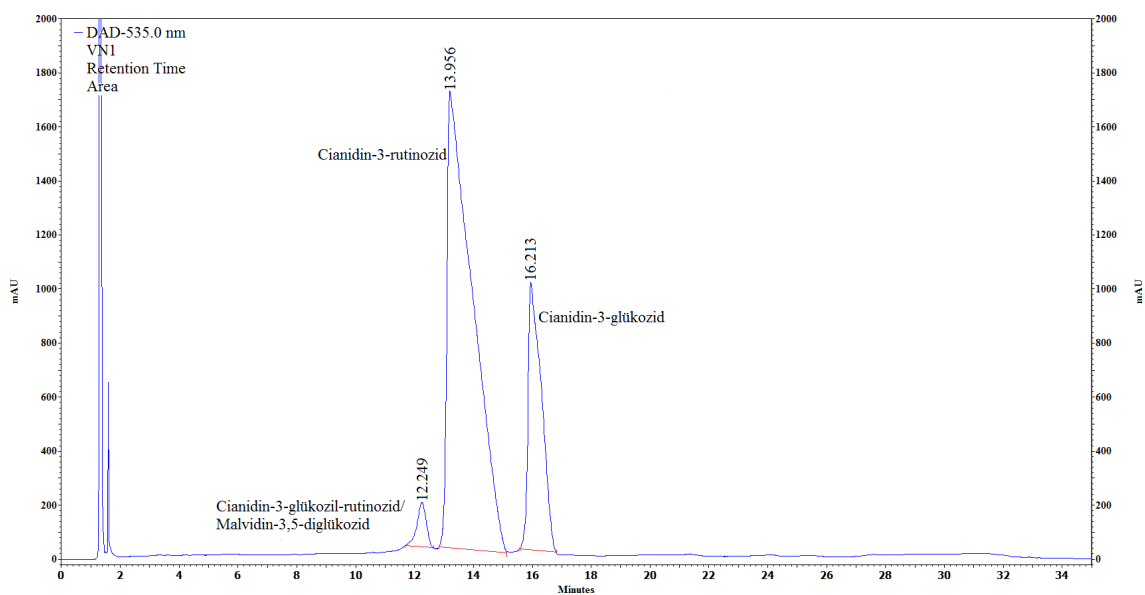
3. ábra: Malvidin-3,5 diglükózid standard kromatogram



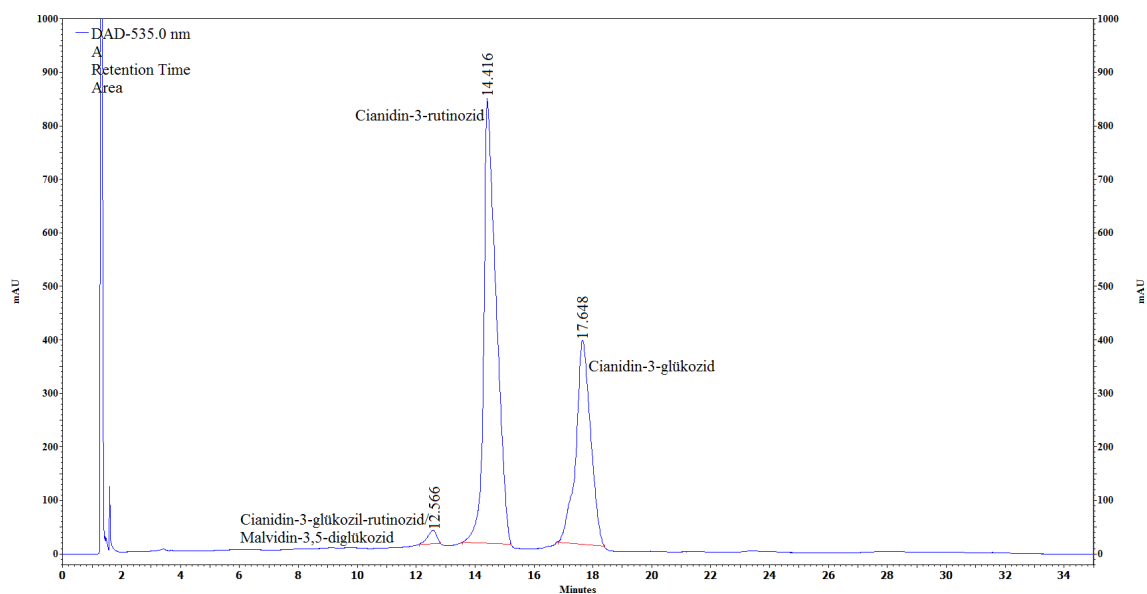
5 melléklet: Vizsgált meggyfajták UHPLC kromatogramja.



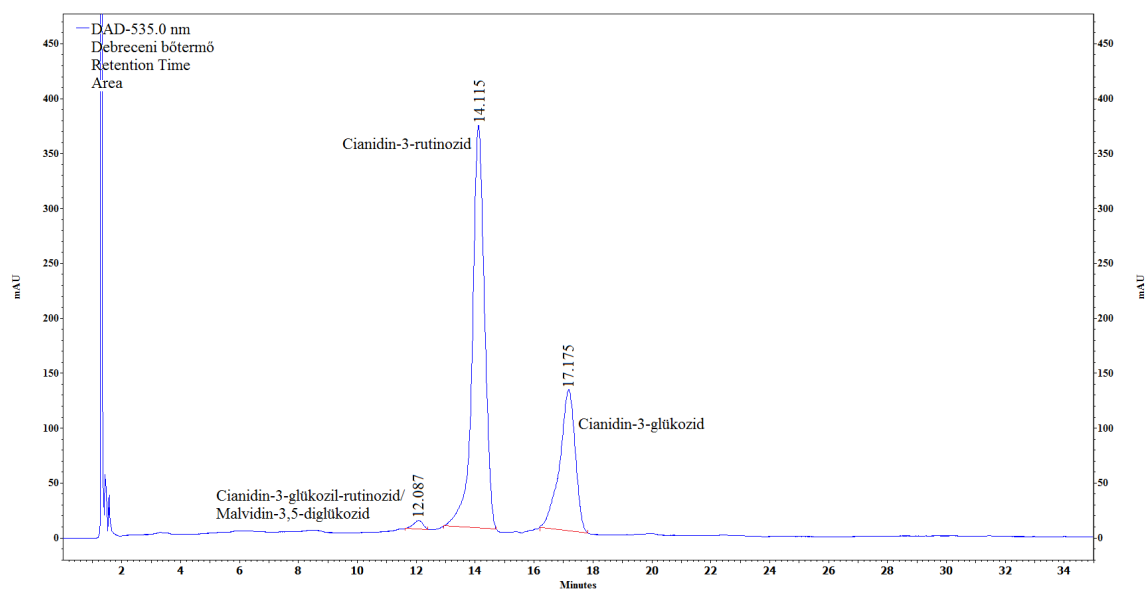
4. ábra: 'Cigánymeggy 59' fajta kromatogramja



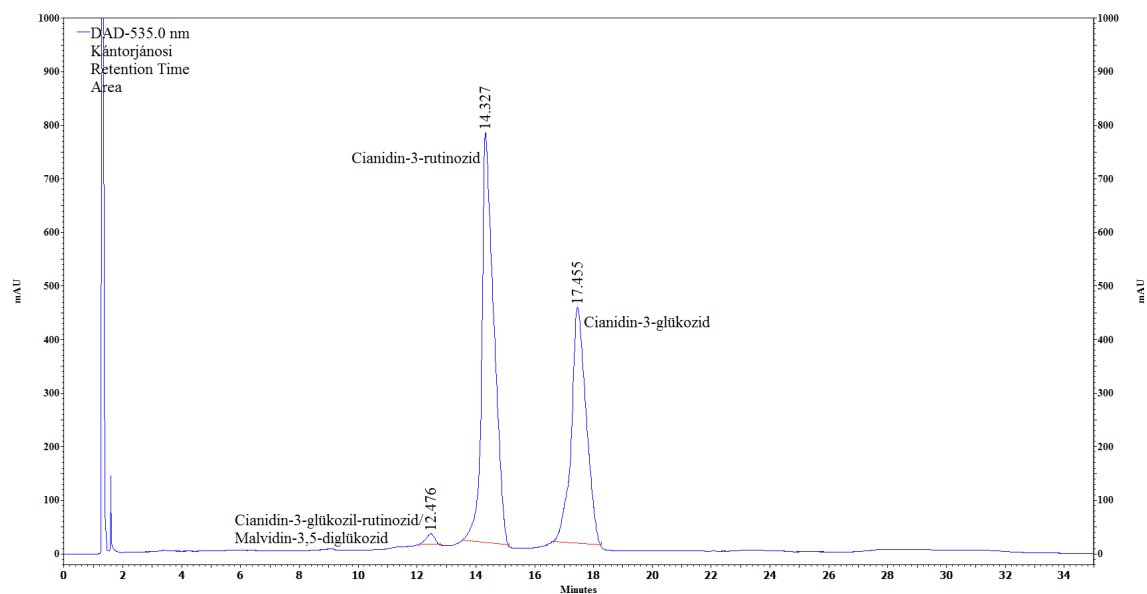
5. ábra: 'VN1' fajta kromatogramja



6. ábra: 'A' fajta kromatogramja

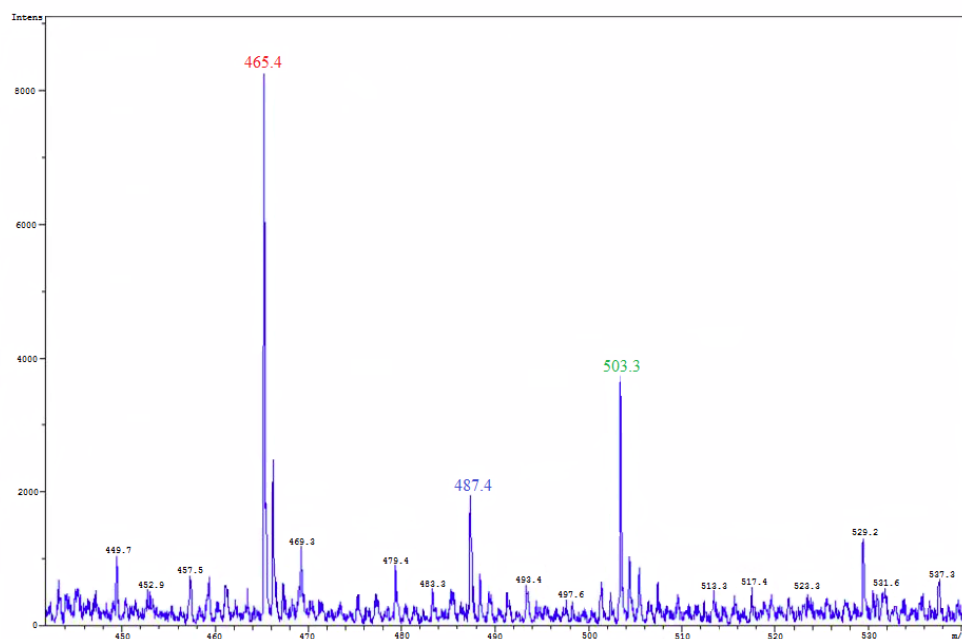


7. ábra: 'Debreceni bőtermő' fajta kromatogramja

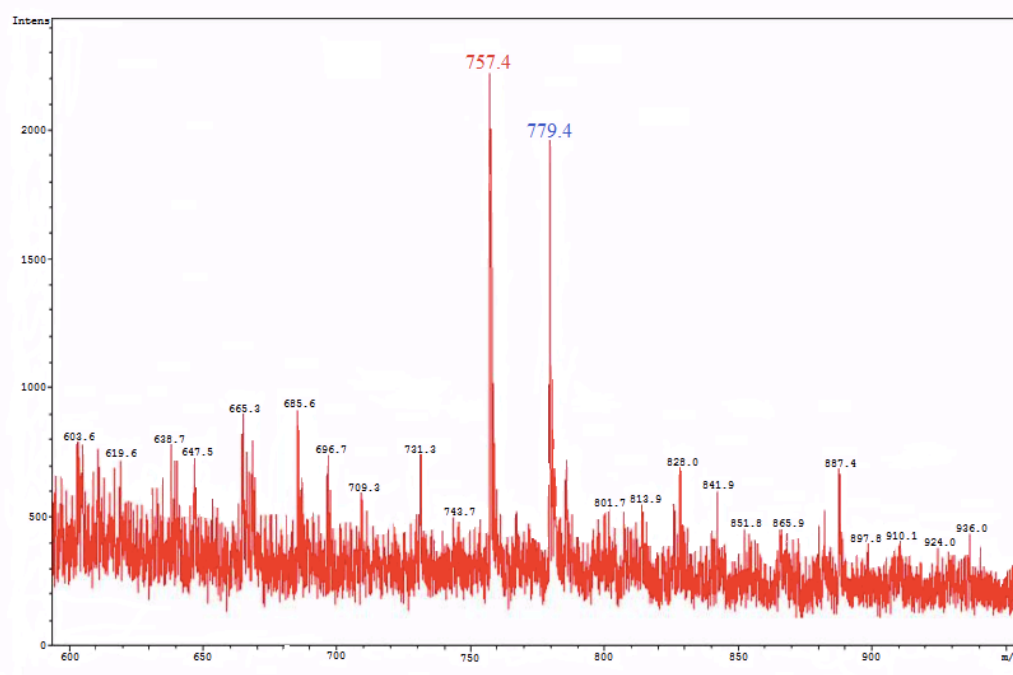


8. ábra: 'Kántorjánosi' fajta kromatogramja

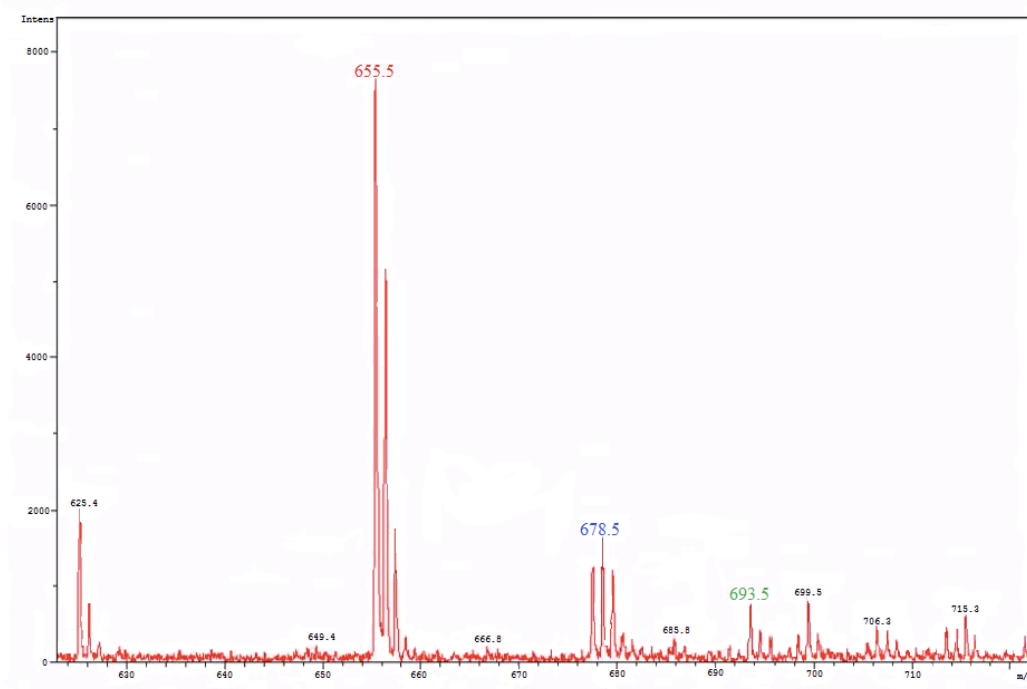
6. melléklet: ‘VN1’ fajta meggykivonatból azonosított antocianinok MALDI-TOF MS spektrumai



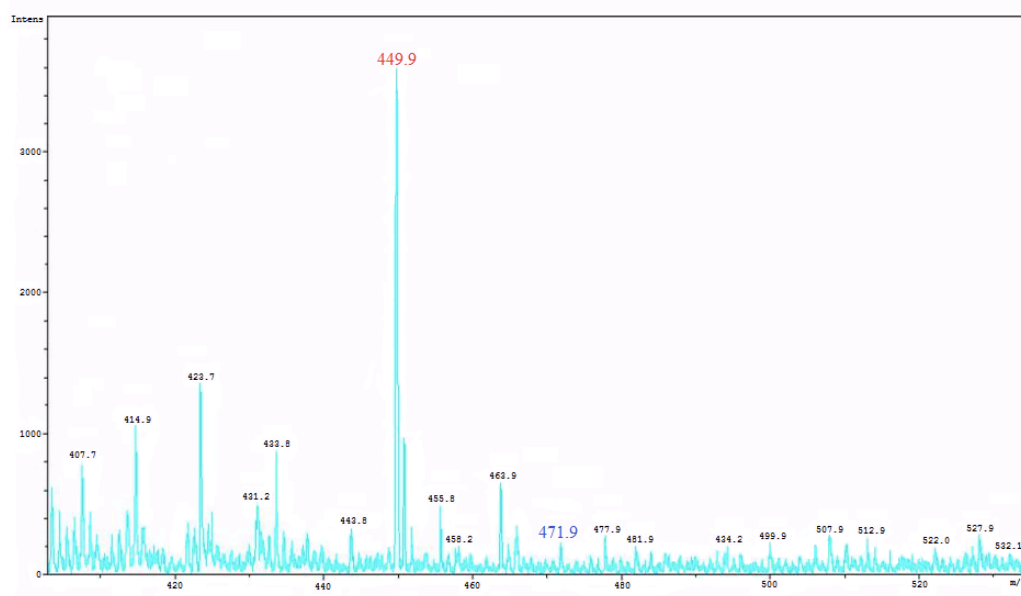
Delphinidin-glükozid mért  $M^+$  465,4 Da,  $[M-H + Na]^+$  487,4 Da és  $[M-H + K]^+$  503,3 Da és számított (465,38 Da) m/z értékei



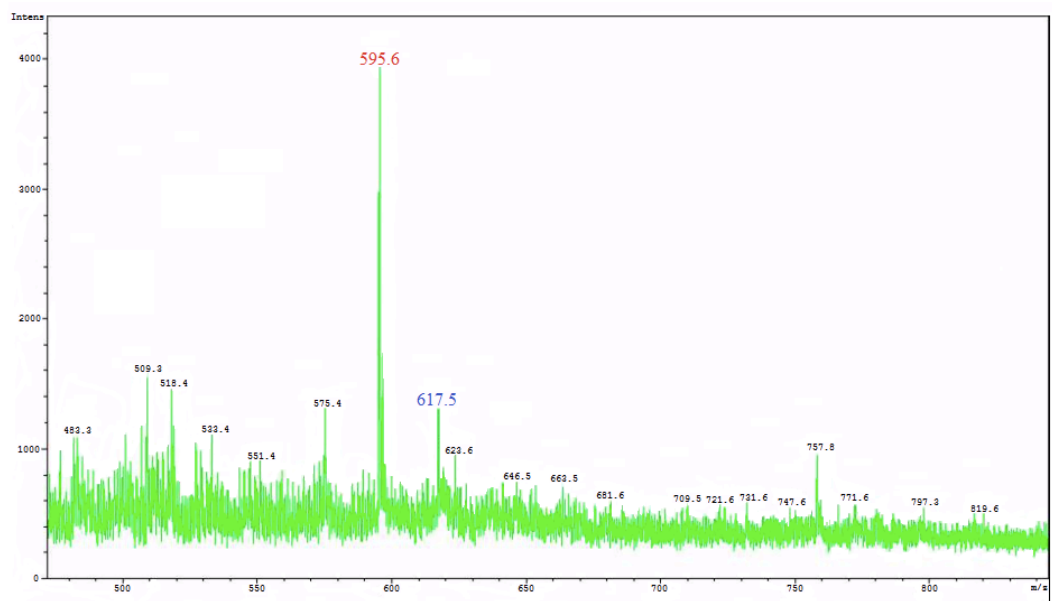
Cianidin-3-O-(2G-glükozil) -rutosid mért  $M^+$  757,5 Da,  $[M-H + Na]^+$  779,4 Da és  $[M-H + K]^+$  és számított (757,66 Da) m/z értékei



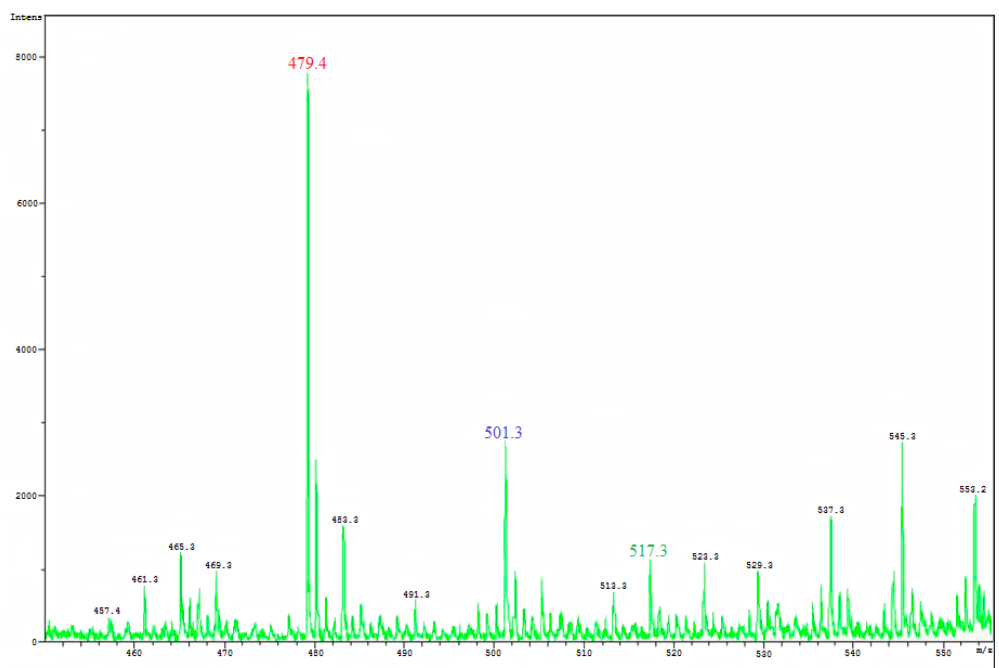
Malvidin-diglükózid mért  $M^+$  655,5 Da,  $[M-H + Na]^+$  677,5 Da és  $[M-H + K]^+$  693,5 Da és számított (655,58 Da) m/z értékei



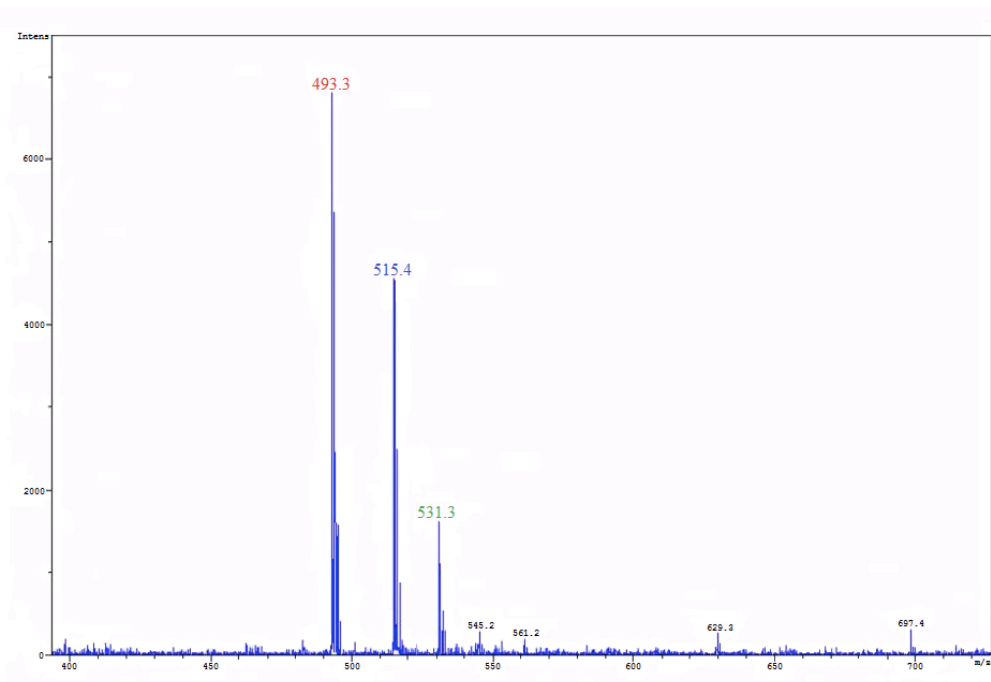
Cianidin-glükózid mért  $M^+$  450,3 Da,  $[M-H + Na]^+$  471,9 Da és  $[M-H + K]^+$  és számított (449,38 Da) m/z értékei



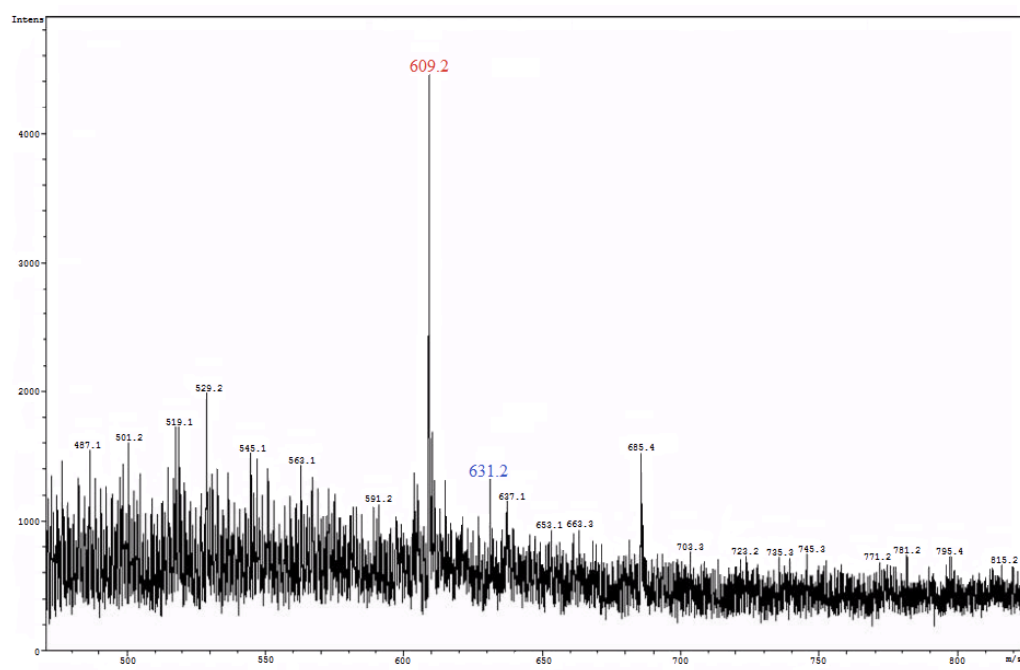
Cianidin-rutinozid mért  $M^+$  595,9 Da,  $[M-H + Na]^+$  617,5 Da és  $[M-H + K]^+$  és számított (595,52 Da) m/z értékei



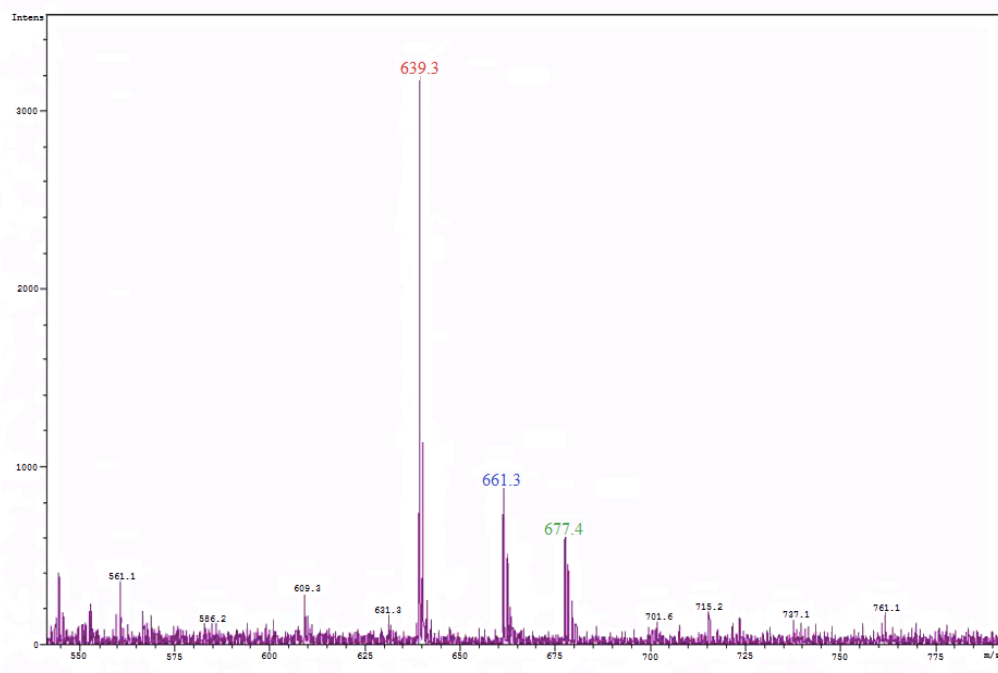
Petunidin-glükózid mért  $M^+$  479,4 Da,  $[M-H + Na]^+$  501,3 Da és  $[M-H + K]^+$  517,3 Da és számított (479,41 Da) m/z értékei



Malvidin-glükózid mért  $M^+$  493,3 Da,  $[M-H + Na]^+$  515,4 Da és  $[M-H + K]^+$  531,3 Da és számított (493,44 Da) m/z értékei

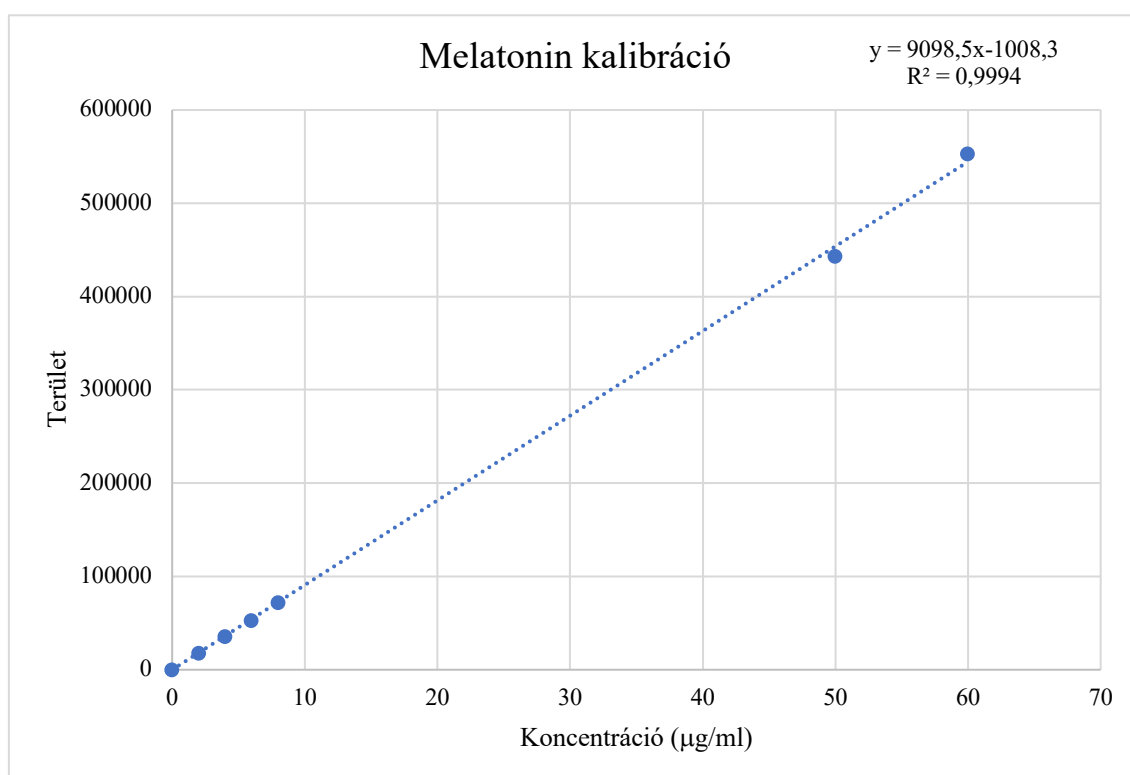
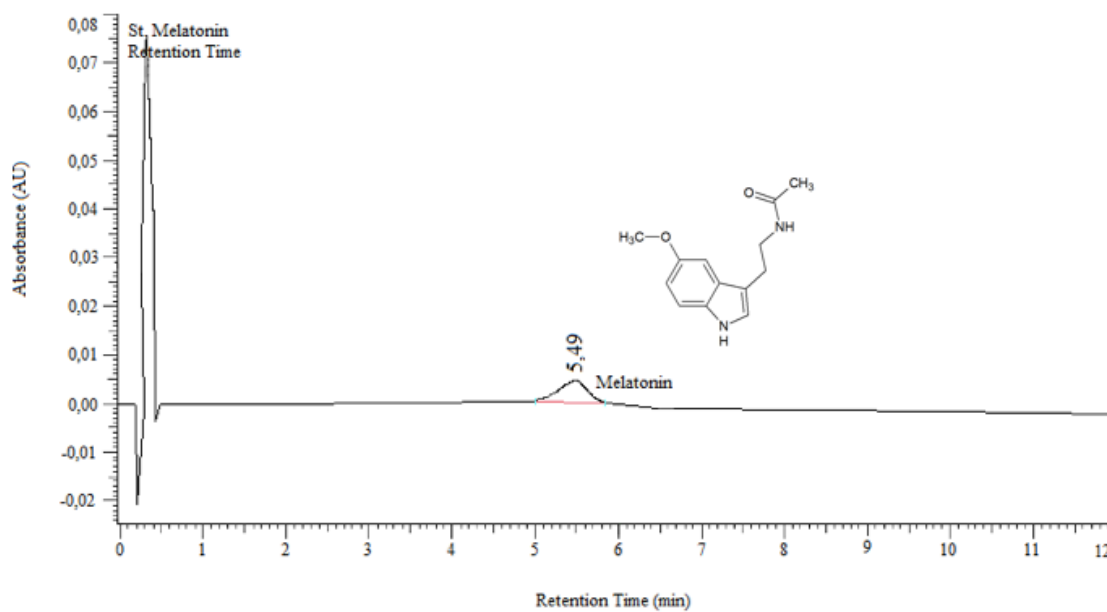


Peonidin-rutinozid mért  $M^+$  609,2 Da,  $[M-H + Na]^+$  631,2 Da és  $[M-H + K]^+$  és számított (609,55 Da) m/z értékei

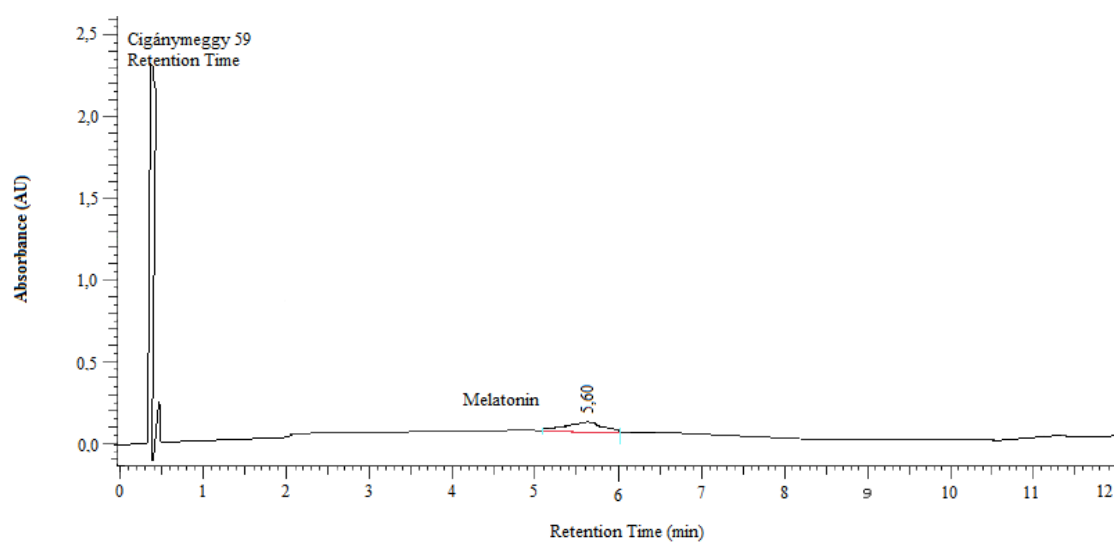


Malvidin-rutinozid mért  $M^+$  639,3 Da,  $[M-H + Na]^+$  661,3 Da és  $[M-H + K]^+$  677,4 Da és számított (639,57 Da) m/z értékei

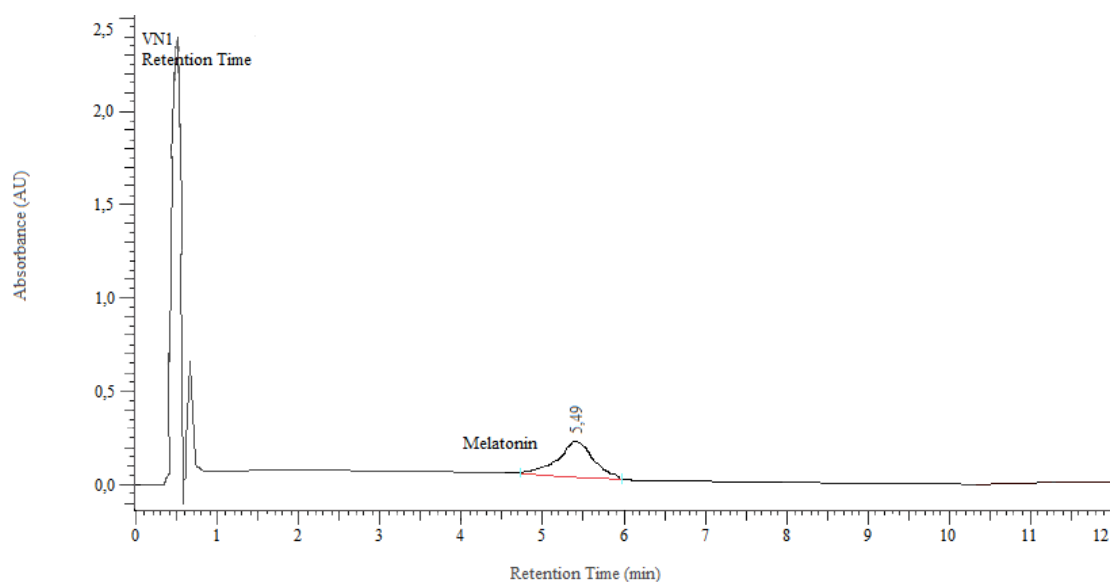
7. melléklet: Melatonin standard kromatogramja és kalibrációs egyenese.



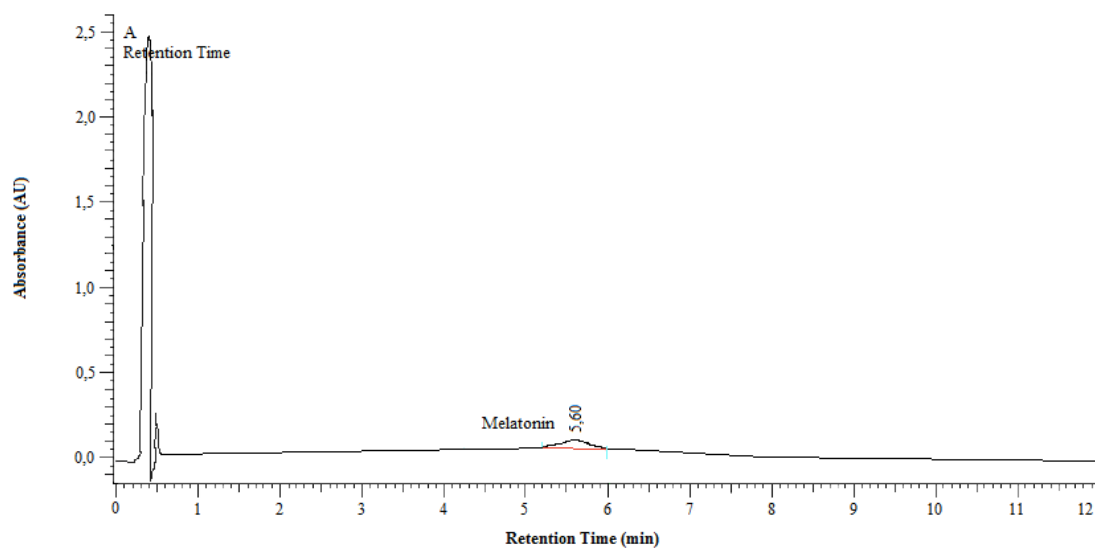
8. melléklet: Vizsgált meggyfajtákból detektált melatonin HPLC kromatogramja.



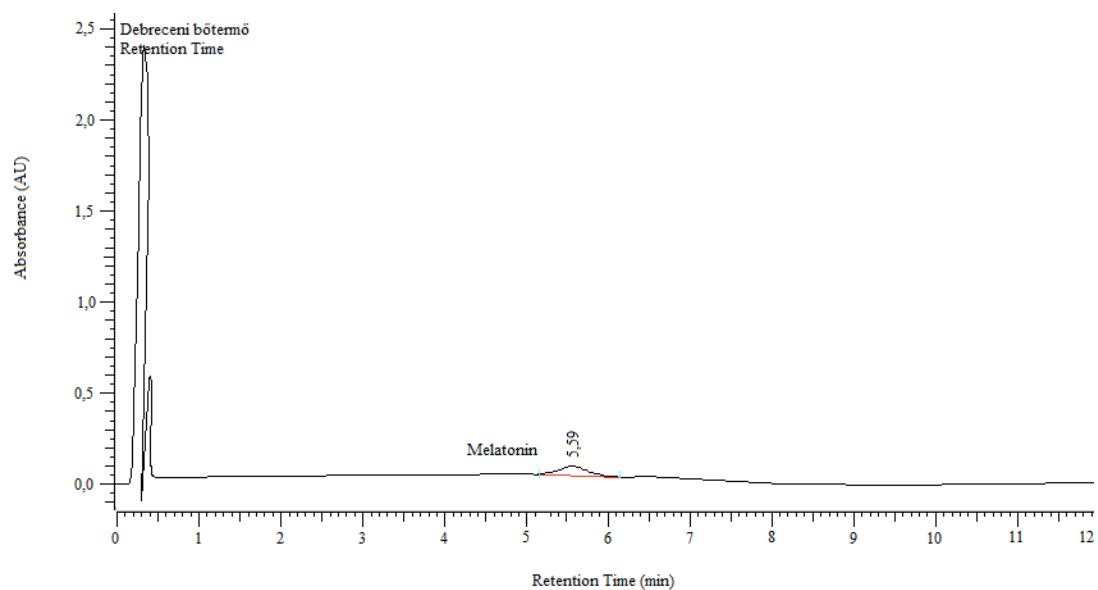
8. ábra: 'Cigánymeggy 59' fajta kromatogramja



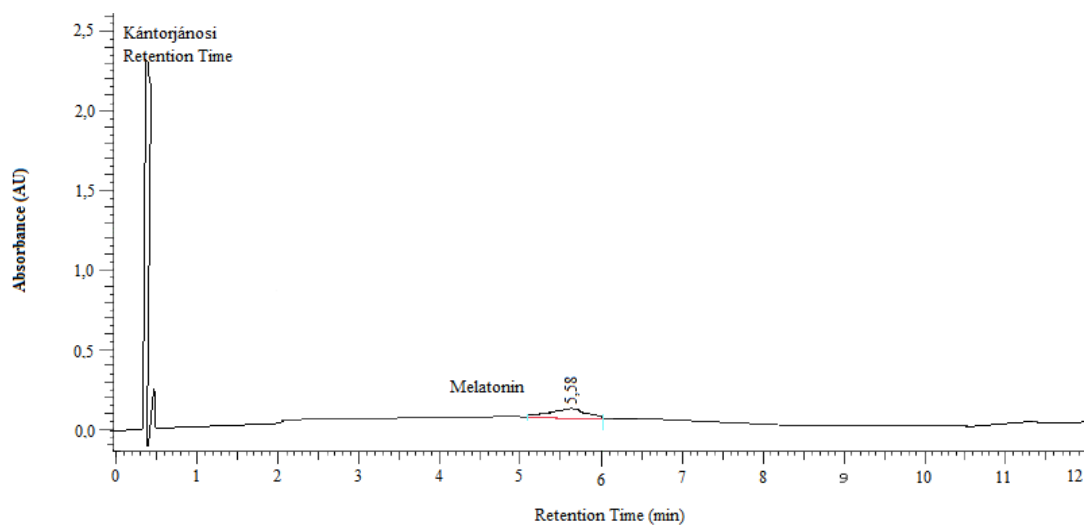
9. ábra: 'VN1' fajta kromatogramja



10. ábra: 'A' fajta kromatogramja

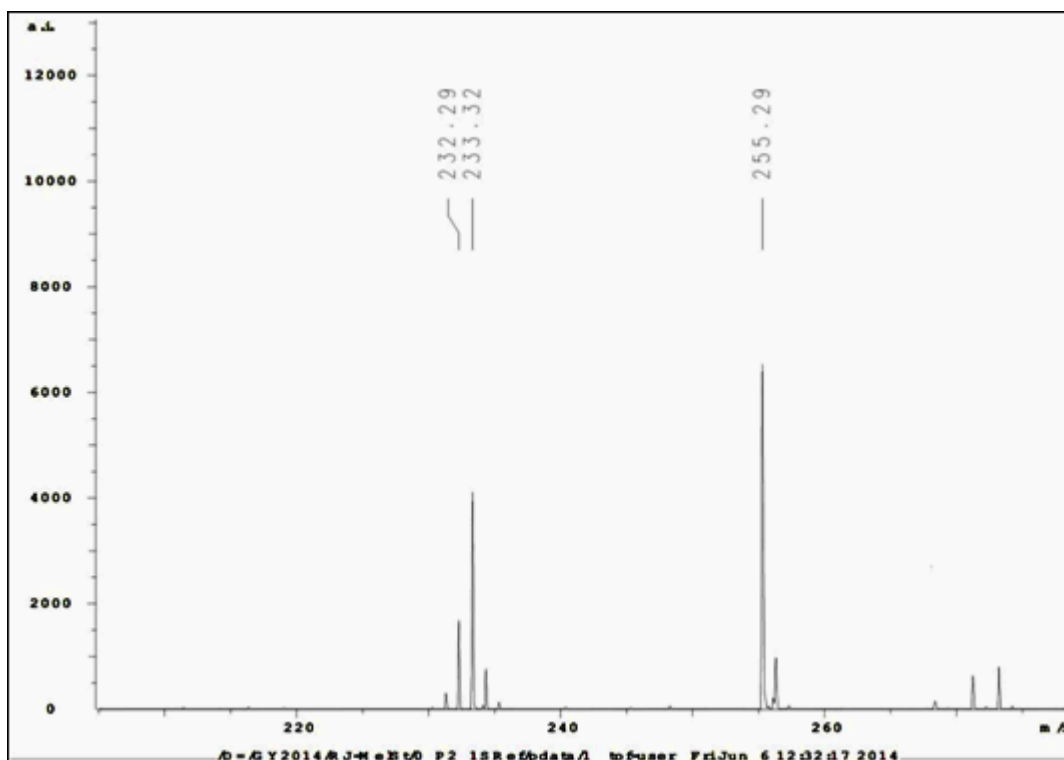


11. ábra: „Debreceni börtető” fajta kromatogramja



**12. ábra:** 'Kántorjánosi' fajta kromatogramja

9. melléklet: Meggykivonatból azonosított melatonin MALDI-TOF MS spektrumai



Melatonin mért  $M^+$  232,29 Da,  $[M-H + Na]^+$  255,30 Da és  $[M-H + K]^+$  273,214 Da m/z értékei

## **15. NYILATKOZAT**

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Kerpely Kálmán Doktori Iskola keretében készítettem, a Debreceni Egyetem doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2020.

..... a jelölt aláírása

## **NYILATKOZAT**

Tanúsítom, hogy Homoki Judit Rita doktorjelölt 2010–2019 között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításunkkal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2020.

..... a témavezető aláírása