

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

dr. Csépanyi Evelin

Témavezető: Dr. Bak István



DEBRECENI EGYETEM

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2016

Természetes eredetű anyagok toxicitásának és kardiovaszkuláris hatásainak vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: dr. Csépanyi Evelin okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája (Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Bak István, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora

Dr. Szentandrassy Norbert, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem, GYTK, Gyógyszerhatástani Tanszék könyvtára

2016. október 28. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora

Dr. Csont Tamás Bálint, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora

Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora

Dr. Csont Tamás Bálint, PhD

Dr. Szentandrassy Norbert, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme,

2016. október 28. 13 óra.

Tartalomjegyzék

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései.....	3
2. Anyagok és módszerek	6
2.1. Meggymagbél kivonat toxicitásának vizsgálata	6
2.2. Béta-karotin kardiovaszkuláris hatásainak vizsgálata	9
3. Az értekezés új tudományos eredményei.....	15
Meggymagbél kivonattal végzett kísérletek eredményei	15
Makroszkópikus vizsgálatok.....	15
Szérum metabolit és enzim aktivitás vizsgálat eredményei	15
Szövetpatológiai vizsgálatok eredményei	15
Meggymag olajjal végzett vizsgálatok	16
Bőr toxicitási vizsgálatok.....	16
Meggymagolaj hatása UV sugárzás okozta károsodások kivédésére. 16	
Béta-karotinnal végzett kísérletek eredményei.....	17
Béta-karotin dózisok hatása a szívfunkciókra, iszkémia/reperfúzió átesett izolált szívekben	17
A béta-karotin hatása az iszkémia/reperfúzió okozta infarktusz terület nagyságára és a szöveti antioxidáns kapacitásra (TAC)	18
A béta-karotin hatása a hem-oxigenáz-1 (HO-1) fehérje expresszióra	18
Béta-karotin citotoxicitásának vizsgálata.....	19
4. Összefoglalás	20
5. Publikációk jegyzéke	22

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

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

A prevenció fontosságát, bármely betegséggel kapcsolatban, nem lehet eléggé hangsúlyozni, én a jövő terápiájának nevezném személy szerint, bár nyilván nem minden kórt lehet megelőzni, azonban a késleltetés rendkívül fontos.

A prevenció részeként a táplálékkiegészítőkhez kötődően a komplex egészséges életmódról kell beszélni elsődlegesen, melynek részét képezi az egészséges táplálkozás, a testmozgás, valamint a lelki egyensúly. A mai kor emberének alkalmazkodnia kell az idők folyamán kialakult élethez. Gondolok itt a mozgás beiktatására rohanó mindennapjainkba, a stressz kezelésének fontosságára és legfőképp a tápanyagokban, táplálékunkban található vitaminok, ásványi anyagok, nyomelemek, rostanyagok kiegészítésére, pótlására. Ez utóbbi esetében a leghatékonyabb eszközök a táplálékkiegészítők, melyeknél nagyon fontos a minőség, a megfelelő formulálás, az ár és a marketing.

Elmondhatjuk, hogy most éljük a táplálékkiegészítők korát, amikor is jellemző a túlhasználat és a nem megfelelő, akár ártalmas készítmények kiválasztása, szedése. Számptalan természetes eredetű hatóanyagot

tartalmazó terméket kínálnak a gyógyszertárak, drogériák és az internetes áruházak, melyeket az emberek megfelelő tudományos adatok és megalapozottság nélkül alkalmaznak.

A kutató társadalomnak igazodnia kell a kezében lévő tudás hozzáadásával, a jövő hatékonyabb és az emberi szervezetre nem káros hatóanyagainak felderítésével, ezek részletes vizsgálatával, melynek eredményeképpen biztonságosan használható táplálékkiegészítők fejleszthetők, vagy nem toxikus hatóanyagszintek meghatározhatók.

Ehhez kapcsolódóan korábbi kutatómunkánk folytatásaként, ahol a természetes eredetű meggybél kivonat összetételét, kardiovaszkuláris és retina károsító hatásait vizsgáltuk. E téma következő állomásaként további toxikológiai vizsgálatoknak tettük ki ezt a komplex növényi származékot, ezt követően pedig a béta-karotin élő szervezetre, kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett hatásait vizsgáltuk.

- I Kísérleteink első részében a meggybél kivonattal történő kezelések hatását vizsgáltuk vér biomarkerek szintjére, illetve a máj és a vese morfológiai változásaira. Ezen természetes anyaggal végzett kutatások részeként tengerimalac leborotvált csupasz bőrén vizsgáltuk a magolaj toxicitását, valamint különféle koncentrációban meggybél olajat tartalmazó krém által kifejtett fotoprotekciót.

II Kísérleteink második részében egy másik természetes eredetű hatóanyagot, a béta-karotin hatásait vizsgáltuk. A patkányok hosszú idejű alacsony és magas dózisos kezelése során a szívfunkciókra kifejtett hatást, az iszkémia és a totál antioxidáns kapacitás változását, a HO-1 szintekben bekövetkező változást és a sejtéletképességre kifejtett hatást vizsgáltuk. A kezeléseket követően az állatokat extermináltuk, majd izolált dolgozó szív preparátumon vizsgáltuk iszkémia/reperfúzió során a szívparamétereket, majd ezen protokollt követően meghatároztuk a szívek infarktusz területeit, HO-1 enzim szintjét, totál antioxidáns kapacitását. Ezen kísérletsorozat részeként H9c2, kardiomiocita sejteken vizsgáltuk a béta-karotin esetleges citotoxicitását különböző koncentrációkban, hogy a tapasztalt szívhatásokat alá tudjuk támasztani egy másik aspektusból is.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Meggymagból kivonat toxicitásának vizsgálata

Meggymagból kivonat preparálása

A meggymagok szárítását követően a csonthéjat eltávolítottuk, majd a meggymagbelet eldörzsöltük, míg megfelelő nem lett a konzisztenciája az állatokon végzett gyomorszondás kezelésekhez. Ez a kivonat egyaránt tartalmazta a mag olajos és száraz frakcióját. A bőrön végzett vizsgálatokhoz a csonthéj nélküli meggymagból nagy nyomású préselésével előállított magolajat használtuk.

Kísérleti állatok

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

Kezelési protokoll

Az egereket random módon 5 csoportba osztottuk, a kezeléseket megelőzően. 8 napig napi egyszeri alkalommal gyomorszondán keresztül kaptak a 0-3000 mg/kg dózistartományban kezelést a következő módon; I.

csoport, kontroll csoport, fiziológiás sóoldat (n=7), II. csoport, 250 mg/kg meggy-mag kivonat (n=7), III. csoport, 500 mg/kg meggy-mag kivonat (n=8), IV. csoport, 1000 mg/kg meggy-mag kivonat (n=8), V. csoport, 3000 mg/kg meggy-mag kivonat (n=6).

Orális toxicitási vizsgálatok

Gyomorszondás kezeléseket végeztünk a meggy-mag máj- és vesetoxicitásának vizsgálatára. A kezelés befejeztét követően, az állatokat nátrium-pentobarbitállal (80 mg/kg) elaltattuk, az anesztézia ideje alatt lemértük az állatok súlyát, majd termináltuk őket. Ezt követően vérmintát vettünk, kimetsztük a májat és a vesét; jéghideg sóoldatban mostuk a szöveteket, majd 10%-os formalinban fixáltuk.

Makroszkópikus vizsgálat

Az összes egeret teljeskörű posztmortem vizsgálatnak vetettük alá. Has-, törzs-, és koponya-üri vizsgálatokat végeztünk abnormalitások felderítésére. A máj és vese tömegét lemértük, majd kiszámoltuk a teljes testtömeghez viszonyított relatív tömegüket.

Szérum metabolitok és enzim aktivitások meghatározása

Az Asan Pharmaceutical-tól (Szöul, Korea) vásárolt kitéket használtunk a toxikus hatások, a vese és máj funkció romlás, vizsgálatára vér-biomarkerek segítségével. A mérésekhez a vérmintákat állni hagytuk 1 órán át, majd 300 x g-n 10 percig centrifugáltuk, hogy a szérumot kinyerjük. Ezt követően a kiték leírásának megfelelően elvégeztük a méréseket. A szérum vér-urea-nitrogén (BUN) és kreatinin szint a vese funkció jelzésére szolgált. A máj funkció monitorozására szérum glutamin

oxálacetát transzamináz (GOT) aktivitás, szérum glutamin piruvát transzamináz (GPT) aktivitás és szérum alkalikus foszfatázt mértünk.

Hisztopatológiai/mikroszkópos vizsgálat

A 10%-os formalin oldatban fixált vese és máj szövetekből 5 µm vékony metszeteket készítettünk. A szövettani metszeteket hematoxylin-eozinnal festettük, majd fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk (10X és 20X nagyításban).

Bőr toxicitási vizsgálatok

A meggyماغból olaj bőrön kifejtett allergén vagy esetleges károsító hatásának vizsgálatához a tengerimalacokat elaltattuk i.p. adagolt pentobarbitál-nátriummal (30 mg/kg dózisban) a vizsgálatok elvégzéséhez. Az anesztézia ideje alatt az állatok hátán lévő szőrt levágtuk, majd a mikroszőrök eltávolítása érdekében borotváltuk is a bőrfelületet. Az olajat, 1, 2, 3, 4, 5 µl mennyiségben öt állat epilált bőrfelületébe masszíroztuk be. A kontroll csoportnál (n=5) desztillált vizet használtunk a bőrön. Kezdetben az állatokat óránként vizsgáltuk, majd napi két alkalommal, három héten keresztül.

Fényvédelem/fototoxicitási vizsgálatok

Vizsgáltuk az olaj bőrre kifejtett UV sugárzás elleni védelmét. Öt tengerimalac gondosan borotvált hátbőrére alumínium fóliát helyeztünk, melyre 5 téglalap alakú rést vágtunk. Ezt követően az egyes réseknél lévő bőrfelületeken 0-5 tömeg % meggyماغ olajat tartalmazó kenőcsöt alkalmaztunk. Ezt követően az állatok csupasz bőrét 40 percre UVB sugárzásnak tettük ki. Hat órával a sugárzást követően vizsgáltuk az UVB indukálta bőrkárosodást és a védőhatást a kezelt és kezeletlen

bőrfelületeken, melyet a meggy mag olajat tartalmazó készítmény eredményezett.

Statisztikai analízisek

SPSS statisztikai analízis szoftvert segítségével student t-tesztet használtunk a kapott eredmények elemzésére. Ennek során vizsgáltuk a kezelt csoportok és a kontroll állatscsoportok közti különbségek szignifikancia értékeit, a szervek tömegére vonatkoztatott enzim aktivitások szempontjából. Minden összehasonlításnál a $p < 0.05$ küszöbértéknél tekintettük szignifikánsnak a változást.

2.2. Béta-karotin kardiovaszkuláris hatásainak vizsgálata

Kísérleti állatok

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

Állatscsoportok és béta-karotin kezelés

A tanulmány során használt patkányokat 3 csoportba osztottuk és a szondán keresztüli kezeléseket a következők szerint kapták; kontroll csoport hidroxietilcellulóz-víz (1:4), alacsony dóziszú béta-karotin (30 mg/kg/nap) és magas dóziszú béta-karotin (150 mg/kg/nap) hidroxietilcellulóz-víz (1:4)

elegyében szuszpendálva. Az all-transz béta-karotint a Sigma-Aldrich Kft.-től rendeltük.

Iszkémia-reperfúzió és izolált dolgozó szív

A 4 hetes vivőanyagös vagy béta-karotinos kezelést követően a patkányokat intraperitoneális ketamin-xylazin (75/10 mg/kg) injekcióval elaltattuk, valamint intraperitoneálisan adott heparinnal (1000 IU/kg) antikoaguláltuk. Torakotómiát követően a szíveket kimetszettük és jégheideg módosított összetételű Krebs-Henseleit bikarbonát pufferbe (118,5 NaCl, 4,7 KCl, 2,5 CaCl₂ × H₂O, 25 NaHCO₃, 1,2 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, és 10,0 glükóz (mM)) helyeztük, majd az aortán keresztül kanuláltuk és Langendorff, „nem dolgozó” módban (100 vízcentiméter) 5 percen keresztül perfundáltuk, hogy kimossuk a vért. Ezután a Langendorff perfúzió alatt kanuláltuk a pulmonáris vénát, majd az izolált szív preparátumot átkapcsoltuk „dolgozó” módba (17 vízcentiméter előterheléssel). A dolgozó perfúzió 10 percét követően, 30 perces globál iszkémiát váltottunk ki a pulmonáris beáramlás és az aorta kiáramlás lekötésével. Az iszkémiás periódus végén a ki- és bemenő ágak felengedésével 120 perces reperfúzió következett. A reperfúzió első tíz percét Langendorff perfúzióban viteleztük ki a fatális kamrai aritmiaák megelőzése érdekében.

Szívfunkció mérések

Az izolált szívek alap értékeinek mérése a dolgozó perfúzió 10 percét követően történt. A bal kamra felépülésének vizsgálatára a paramétereket a reperfúzió 30., 60. és 120. percében mértük. A szívfrekvencia mérését a számítógép adatgyűjtő rendszerével (AD Instruments, PowerLab 4/25T) végeztük; a koronária kiáramlás értékeit

adott időtartamig a szívből kicsöpögő folyadék mennyiségének mérésével határoztuk meg; az aorta kiáramlás mértékét kalibrált áramlásmérővel mértük; a teljes kiáramlást az aorta- és a koronária-kiáramlás összegeként határoztuk meg. A verőtérfogatot a teljes kiáramlás és a szívfrekvencia hányadosaként, valamint a verőtérfogat változást, a kezelések függvényében, a reperfúziós és az alap verőtérfogat értékeinek hányadosaként, százalékban fejeztük ki.

Infarktusos terület mérése

Az infarktusos terület meghatározására TTC festési metodikát alkalmaztunk. A 30 perces iszkémiát és 120 perces reperfúziós periódust követően a szíveket 50 ml 1 v/v %-os TTC oldattal perfundáltuk, majd a mintákat -70 C-on tároltuk a későbbi analízisig. A fagyasztott mintákat szeleteltük, a szeletek tömegét lemértük és megszárítottuk. A száraz szeleteket Epson J323D készülékkel beszkeneltük. Az infarktusos területet és a veszélyeztetett területet (teljes szív) planimetriás szoftver (Image J, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) segítségével határoztuk meg. Az infarktusos terület nagyságát a szeletek tömegével megszoroztuk, és ezeket összegeztük. Az eredményként kapott érték az infarktusos területek tömege. Az infarktus méretét, az infarktusos szövet tömegének és a veszélyeztetett terület (teljes szív) tömegének hányadosaként, százalékban lett kifejezve.

Szívszövet HO-1 szintjének Western blot analízise

A szívszövetben a HO-1 enzim szintet Western blot módszerrel vizsgáltuk, az alábbiak szerint. Körülbelül 300 mg bal kamrai szívszövetet jégen izoláló pufferben (25 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, 1 mM ortovanadát, 10 mM NaF, 10 mM pirofoszfát, 10 mM okadán sav, 0,5 mM

EDTA, 1 mM PMSF, és 1 × proteáz inhibitor koktél) szövet homogenizátorral (IKA T10 basic ULTRA-TURRAX®) homogenizáltuk és centrifugáltuk (Harrier 18/80R) (2000 rpm, 4 C, 10 perc). A felülúszókat új centrifuga csövekben 10000 rpm-en 4 C-on 20 percig centrifugáltuk tovább, majd az így kapott felülúszót használtuk, mint citoszólikus frakciót. A fehérje koncentrációt ND-1000 Nano Drop spektrofotométerrel mértük (BCA Protein Assay Kit Thermo Scientific, Rockford, IL). 30 mikrogramm fehérjét redukáló 10%-os poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) szeparáltunk, majd 0,45 µm pórusátmérőjű nitrocellulóz membránra transzferáltuk a minták koncentrációja céljából. A membránok blokkolását követően, melyet TBST-ben oldott 7 %-os sovány tejjel végeztünk, egy éjszakán át az elsődleges antitestet (GAPDH (Cell Signaling Technology) 1/40000; HO-1 (Sigma-Aldrich) 1/50) tartalmazó 1 %-os sovány tejporos TBST-vel inkubáltuk 4 C-on. Ezt követően a membránokat 3x10 percig mostuk TBST-vel, majd 2 óráig inkubáltuk tormaperoxidáz-enzimmel konjugált másodlagos antitesttel, mely 1 %-os sovány tejporos TBST-ben lett készítve. A membránokat Western blot erősített kemilumineszcens HRP szubsztráttal kezeltük, hogy a jeleket láthatóvá tegyük. Az erősített kemilumineszcens kezelés után a membránokat röntgen filmre (Agfa, Mortsel, Belgium) hívtuk elő. A filmeket ezután digitalizáltuk (Epson J232D szkennel), ImageJ program segítségével analizáltuk, majd a HO-1 jelintenzitást GAPDH-ra normalizáltuk.

MTT sejt életképesség vizsgálat Béta-karotin citotoxicitásra

A béta-karotin citotoxicitását MTT esszét alkalmazva vizsgáltuk. H9c2 sejteket (ATCC, CRL-1446, LGC Standard GmbH, Wesel Germany) vettünk fel és hígítottunk médiumban (Dulbecco's modified eagle's médium

Sigma-Aldrich Kft., 10 % FBS és 1 % penicillin-sztreptomicin antibiotikum), majd 96 lyukú plate-re 3000 sejt/lyuk sűrűséggel raktuk ki a sejteket ezt követően 1 napig tenyésztettük. A sejtek kezelését 4 órán keresztül 0, 2,5, 5, 10 és 20 μM -os béta-karotinnal végeztük. 30 perccel a kezelés elvégzése után a sejtek felét 125 μM H_2O_2 -al kezeltük meg. A négy órás inkubációt követően 20 μl MTT oldatot (5mg/ml PBS-ben) adtunk minden lyukhoz és 3 órán keresztül 37 C-on inkubáltuk a mitokondriális felvétel biztosítására. A médium eltávolítása után a sejteket 150 μl isopropanol hozzáadásával lizáltuk, majd 15 perc inkubációt követően plate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech) segítségével mértük az abszorbanciát 570 és 690 nm-en. Minden egyes kísérletnél, az abszorbancia értékek átlagai 4 párhuzamosan mért replikát lyuk eredményei lettek, és a kísérletsorozatot 3 alkalommal ismételtük. A béta-karotin citotoxicitási hatás vizsgálatok az abszorbancia értékek és az MTT-vel mért H9c2 sejt életképesség között lévő egyenes arányosságon alapultak. Ezen eredményeket a 4 órás béta-karotin kezelés utáni sejt túlélés, valamint a béta-karotinnal nem kezelt sejtek túlélésének százalékaként fejeztük ki.

Szöveti Antioxidáns Kapacitás (TAC) meghatározása

A szívszövet totál antioxidáns kapacitását a CS0790-1KT antioxidáns esszé kittel (Sigma-Aldrich Kft., Bp, Magyarország) mértük. A vizsgálatokat a szívizolálást követően -70 C-on tárolt szívszövetekből végeztük. Körülbelül 100 mg bal kamrai szívszövetet 0,5 ml „esszé puffer”-ben homogenizáltunk (IKA T10 basic ULTRA-TURRAX[®]), majd 12000 rpm-en centrifugáltuk 15 percig 4 C-on, ezt követően a felüliszókat használtuk az esszéhez. A felhasználói kézikönyv szerinti minta előkészítést követően, plate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech) segítségével

mértük az abszorbancia értékeket 405 nm-en. A TAC értékeket minden egyes szív esetében Trolox ekvivalensben (μM) fejeztük ki.

Statisztikai analízis

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

3. Az értekezés új tudományos eredményei

Meggymagbél kivonattal végzett kísérletek eredményei

Makroszkópikus vizsgálatok

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

Szérum metabolit és enzim aktivitás vizsgálat eredményei

Eredményeink alapján elmondható, hogy nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kezelt csoportok és a kontroll csoport között egyik vizsgált paraméter esetén sem. Megfigyelhető továbbá, hogy a kezelt csoportok értékei között sincs szignifikáns különbség.

Szövetpatológiai vizsgálatok eredményei

A vese hisztopatológiai vizsgálata

A kontroll és a 250, 500, valamint 1000 mg/kg meggymagbél kivonattal kezelt állatokból származó metszetek esetén a húgyúti- és vérérdények, ezen kívül a malpighi testek láthatóak és normálisak. Ellenben a 3000 mg/kg meggymagbél kivonattal kezelt csoport állataiból származó vesék képein kongeszció látható a vér- és húgyúti edényeken és szöveti mikrostruktúra változás figyelhető meg, mely gyulladás okozta károsodásra utal. A húgyúti és malpighi tubulusokat, a vérérdényeket és a kötőszöveti sejteket kellő részletességgel vizsgáltuk, hogy feltárjuk az abnormalitásokat.

A máj hisztopatológiai vizsgálata

A vizsgálatok során olyan szerkezeti jellegzetességeket vizsgáltunk, mint például hepatociták, máj vezetékek, üregek, és az egész struktúra. Semmilyen abnormalitás nem volt látható egyik kezelt csoportban sem és a máj szövete morfológiailag épnek tűnt mindegyik dózistartományban.

Meggyماغ olajjal végzett vizsgálatok

Bőr toxicitási vizsgálatok

A kezelt és a kontroll állatok összehasonlításából kiderült, hogy a tengerimalacok bőrén alkalmazott különféle dózisú meggyماغ olajjal kezelt bőr nem különbözött a desztillált vízzel kezelt állatok bőrétől. 21 nap elteltével egyik kísérleti állaton sem láttunk negatív elváltozásokat a bőrön; allergiás- vagy más toxikus reakciókat, amit az olaj okozhatott.

Meggyماغolaj hatása UV sugárzás okozta károsodások kivédésére

Az UVB sugárzásnak kitett bőrfelületen a sugárzást követő 2 óra elteltével jelentős mértékű pirosság volt látható, mely maximumát 6 óra elteltével érte el, ekkor értékeltük a protektív hatást. A 0, 1 és 2 % olajat tartalmazó krémek nem mutattak protektív hatást. A 3 és 5% meggyماغ olaj tartalmú kenőcsök, szignifikáns mértékben védték a bőrt az UVB sugárzás okozta bőrpír kialakulásával szemben.

Béta-karotinnal végzett kísérletek eredményei

Béta-karotin dózisok hatása a szívfunkciókra, iszkémia/reperfúzió átesett izolált szívekben

Eredményeink alapján elmondható, hogy az aorta kiáramlás értékeiben nem volt szignifikáns különbség a kezelések hatására a kontroll csoporttal összehasonlítva. Megfigyelhető továbbá, hogy az iszkémiát követő reperfúzió 30. és 60. percében az alacsony dózissal kezelt állatokból izolált szívek esetén szignifikánsan emelkedett aorta kiáramlást tapasztaltunk. Megjegyzendő, hogy az alacsony dózisú kezelés hatására magasabb aorta kiáramlás értékeket kaptunk a magas dózisú csoporthoz viszonyítva. A koronária kiáramlás értékeit megvizsgálva a kezelések hatására nem volt szignifikáns változás iszkémia előtt, illetve 30 perc reperfúziót követően, míg a reperfúzió 60. és 120. percében a magas dózisú kezelés hatására a koronária kiáramlás értékek szignifikánsan magasabbak voltak a kontroll csoporthoz viszonyítva.

Ugyancsak elmondható, hogy iszkémia előtt és a reperfúzió 120. percében nem tapasztaltunk szignifikáns változást a perctérfogat értékekben a béta-karotin kezelések következtében. A kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikáns perctérfogat növekedést tapasztaltunk a reperfúzió 30. és 60. percében azon szívekben, melyek a 30 mg/ttkg dózissal kezelt állatokból származtak, azonban a 150 mg/ttkg dózissal kezelt állatok perctérfogat értékei nem mutattak szignifikáns változást. A szívfrekvencia szignifikáns mértékben nőtt reperfúzió során a kontroll csoporthoz viszonyítva azon állatok esetén, melyek 150 mg/ttkg béta-karotint kaptak.

A béta-karotin kezelés hatását értékelve a szív verőtérfogatára elmondható, hogy sem iszkémia előtt, sem iszkémiát követően szignifikáns

változásokat nem tapasztaltunk. A magas dózisu kezeléseket következtében tapasztalt kardioprotektív hatás csökkenése megfigyelhető a verőterefogat változás eredményeiben is. Az alacsony dózisu kezelést kapott állatok szíveiben az iszkémia előtti értékekhez viszonyítva a reperfúzió 30. és 60. percében tapasztalt verőterefogat csökkenés sokkal kisebb mértékű volt a kontrollhoz viszonyítva.

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

A TTC oldattal perfúzált szívek metszeteinek makroszkópos analízise szignifikáns csökkenést mutatott az infarktusz szívizom kiterjedésében az alacsony dózisu kezelés esetén a kontroll csoport értékeihez képest. Ez a protektív hatás azonban eltűnt azon szívekben, melyek a magas dózissal kezelt állatokból származtak.

Az infarktusz területben bekövetkezett változások szoros összefüggést mutatnak a szöveti antioxidáns kapacitással. Azon szívekben, melyek alacsony dózissal kezelt állatokból származtak; a TAC értékei egyaránt szignifikánsan magasabbak voltak a kontroll csoporthoz és a magas dózisu kezelést kapott állatokból izolált szívekhez képest. Mindemellett azon szívekből mért TAC értékek, melyek magas dózissal kezelt állatokból származtak nem különböztek szignifikánsan azon szívektől, melyek vívőanyaggal kezelt állatokból származtak.

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

Az iszkémia/reperfúzióknak ki nem tett szívek esetén alacsony dózisu béta-karotin kezelés nem okozott szignifikáns emelkedést a HO-1 szintben a kontrollhoz viszonyítva, ellenben a magas dózisu béta-karotin kezelés szignifikáns növekedést eredményezett az enzim expressziójában.

Továbbá az iszkémia/reperfundált szívekben a HO-1 fehérje termelés az alacsony és magas dózisonal egyaránt szignifikáns emelkedést mutatott a kezeletlen nem-károsodott szívekhez viszonyítva. A HO-1 expressziója azon szíveknek, melyek vivőanyaggal kezelt állatokból származnak és iszkémia/reperfúzió estek át, nem különböztek szignifikáns mértékben azoktól a szívektől, melyek az alacsony dózissal kezelt állatokból származtak és iszkémia/reperfúzió estek át, míg a magas dózissal kezelt állatok HO-1 szintje szignifikáns emelkedést mutatott a vivőanyaggal kezelt kontroll csoporthoz képest.

Béta-karotin citotoxicitásának vizsgálata

Az MTT sejtéletképességi esszé eredményei alapján elmondható, hogy a 2,5, 5, 10 μM béta-karotin kezelés szignifikáns sejtéletképesség növekedést okozott a béta-karotinnal nem kezelt kontroll kultúrákhoz viszonyítva, míg 20 μM esetén a tapasztalt protektív hatás eltűnt.

4. Összefoglalás

Magyarország és a világ rossz egészségügyi statisztikai adatai, kellő okot szolgáltatnak az emberiségnek életük megváltoztatására. Világszerte vezető halálokat képviselnek a kardiovaszkuláris megbetegedések, melyeknek egyik fő kockázati tényezője az elhízás. Mindkét állapotban a szervezet folyamatosan fokozott oxidatív stressznek van kitéve. A már fennálló betegségek gyógyszeres kezelésén túlmenően napjainkban egyre nagyobb igény mutatkozik a prevencióra, valamint a terápiák kiegészítésére. Ennek megvalósításában főképp természetes eredetű hatóanyagok játszanak szerepet kedvezőbb toxikológiai és mellékhatás profiljuk miatt.

Kutatócsoportunk meggyombél toxicitásának vizsgálata során egér modellben nem talált káros hatásokra utaló jeleket a máj szövetében. A vese szövetében csak a legmagasabb alkalmazott dózis esetén figyeltünk meg gyulladásra utaló jeleket. Szintén nem tapasztaltunk semmilyen változást a vizsgált vér-biomarkerek szintjében a kezelések hatására. A mag olajtartalmát tengerimalacok bőrén tesztelve fotoprotektívnek bizonyult. Béta-karotinnal végzett kísérleteinkben patkány modellt alkalmazva alacsony dózisban kardioprotekciót tapasztaltunk, négy hetes előkezelést követően. A protekció a posztisztkémiás szívparaméterek javulásában, a csökkent mértékű infarktusz területben, az emelkedett szöveti antioxidáns kapacitásban, valamint a H9c2 sejtek életképességének növekedésében nyilvánul meg.

Eredményeink mindkét természetes eredetű anyag esetében hozzájárulhatnak azok terápiás prevencióra történő alkalmazásában a későbbiek során, valamint a velük kapcsolatos tudományos ismereteink bővítéséhez.

5. Publikációk jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. □ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: www.lib.unideb.hu



További közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,076

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

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

Debrecen, 2016.07.13.

