

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**MEGGY ÉS PAPRIKA BIOAKTÍV VEGYÜLETEINEK VIZSGÁLATA
ENDOTHEL DISZFUNKCIÓBAN**

Biró Attila

Témavezető:

Dr. Remenyik Judit
tudományos főmunkatárs



DEBRECENI EGYETEM
Kerpely Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2021

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

A táplálkozás és az egészségi állapot közötti szoros összefüggésekre epidemiológiai, experimentális és klinikai kutatások is rámutatnak. Egyes állatfajoknál megfigyelhető különböző kórállapotokra adott ösztönös diétaváltoztatás, az ókorig visszanyúló hagyományos kínai orvoslás, az indiai ájurvéda szemlélete, vagy az európai kultúrában – tévesen – Hippokratésznek tulajdonított vélekedés: „*Gyógyszered legyen az ételed, s ételed legyen a gyógyszered*”, majd később: „*Az vagy amit megeszel*” (Feuerbach) korai, empirikus, bizonyos értelemben intuitív, de ma is érvényes táplálkozásbiológiai eredményeknek tekinthetők. Vitaminhiány okozta megbetegedések – skorbut, beriberi – voltak az első olyan esetek, amelyekben a fenti összefüggést ma elfogadott tudományos módszerekkel igazolták, egyúttal a hatékony kezelést is elérhetővé tették. Ennek nyomán vált indokoltá az emberi szervezet tápanyagigényének alaposabb megismerése, széleskörű kutatása, majd az ezekből származó információk alkalmazása, népegészségügyi gyakorlatba ültetése.

A kutatói társadalom és a vonatkozó ipari szereplők jelentős javulást vártak az élelmiszerek ásványi anyagokkal, vitaminokkal történő dúsításától. Egyes betegségek (angolkór, velőcsőzáródási defektusok, golyva, kora/újszülöttkori agyvérzés stb.) morbiditása valóban szignifikánsan csökkent, de más, krónikus bántalmak hasonló statisztikáiban napjainkban is lassú emelkedés tapasztalható. Ilyen megbetegedések – többek között – a II. típusú cukorbetegség, az érlemeszesedés, a szív és keringési rendellenességek, a gyomor-bél rendszeri és daganatos elváltozások. A nyugati társadalmakban megfigyelhető kiemelkedő prevalencia sejteti, hogy a háttérben legalább részben a néhány évtized alatt – evolúciós szemmel nézve pillanatok alatt – átalakuló életmód állhat. A széles spektrumban jelentkező civilizációs ártalmak közül meg kell említeni a mozgásszegénységet, a stressz jellemezte szociokulturális környezetet, a légszennyeződést, az individuum káros szokásai eredményezte negatív élettani hatásokat is, de meghatározó jelentőségű az élelmiszerfogyasztási szokások átalakulása. Ezek mindegyike képes a humán szervezet homeosztázisának felborításával a fent sorolt krónikus betegségek előidézésére.

A WHO már az ezredforduló környékén felhívta a figyelmet a civilizációs betegségek emelkedő morbiditására. Prognózisuk helytállóan bizonyult, a táplálkozással összefüggő civilizációs betegségek komoly közegészségügyi terhet rónak az államok egészségügyi ellátórendszereire. Noha az egészségtudatos táplálkozás követőinek száma

növekszik, sajnos még gyerekcipőben jár, és sokszor kevésbé tudományos trendek is befolyásolják. Az egészségtelen táplálkozás káros következményei, az úttörő élelmiszer módosítási próbálkozások (pl. vitaminpótlás) részbeni sikeressége, az újonnan jelentkező egészségügyi problémák (gluténérzékenység, új vírusinfekciók stb.) szofisztikáltabb megoldásokat kívánnak. Részben olyan élelmiszerek kifejlesztésére ösztönöznek, amelyek jótékony hatásuk révén betegségmegelőző, preventív hatással rendelkeznek. Részben különböző megbetegedések gyógyító, kuratív kezelésére alkalmas hatóanyagok keresését inspirálják. Az utóbbi évtizedekben a gyógyszerhatóanyag-fejlesztéssel kapcsolatos vizsgálatok számottevő része fordult a farmakológiailag aktív növényi eredetű vegyületek irányába (nutraceutikumok). A már alkalmazott törzskönyvezett gyógyszerek (aspirin-fűzfa, paclitaxel- tiszafa, tamiflu-japán csillagánisz stb.) mellett jelenleg is intenzív kutatások folynak növényi eredetű biológiailag aktív komponenseken alapuló termékek fejlesztése céljából.

Minden egyes sejtünk stabil belső környezetének szabályozása (homeosztázis), távolabbi környezetével való interakciója az erek belső falát borító endothel sejtek megkerülhetetlen részvételével valósul meg. Jelentőségüket bizonyítja, hogy számos, a fent említett krónikus megbetegedés patomechanizmusának része az endothelium diszfunkciója. Megelőzési és kezelési stratégiák kialakításában, vizsgálatában intenzíven alkalmazzák laboratóriumi körülmények mellett – többek közt – a hatóanyagkutatásban is. Kísérleteink során biológiailag aktív növényi molekulák hatását tanulmányoztuk olyan megbetegedések *in vitro* modelljén, ahol az endothel diszfunkció központi patogenetikai tényező.

A fentiekben megfogalmazott gondolatok mentén kutatócsoportunk célja volt növényi hatóanyagok keresése, előállítás, tisztítása. Ezt követően *in vitro* modell segítségével a fent említett krónikus betegségekben lejátszódó patofiziológiai folyamatokban vizsgáltuk a meggy és a paprika eredetű vegyületek hatásait.

Munkánk során az alábbi problémákra kerestünk megoldást és a következő kérdéseket kívántuk megválaszolni:

Tisztított antocianin frakcióval kapcsolatos kísérletek

1. Annak tudatában, hogy az antocianinok sokrétű terápiás potenciállal – köztük immunmoduláló hatással – rendelkeznek, célul tűztük ki annak megválaszolását, hogy a meggyből tisztított antocianin frakció (TAF) miképpen befolyásolja az endothel sejtek biológiai folyamatait lipopoliszacharid (LPS) által indukált gyulladási modellünkben.

Allitiaminnal kapcsolatos kísérletek

1. Az *in vitro* vizsgálatokhoz a kereskedelmi forgalomból nem beszerezhető allitiamin kémiai szintézis útján történő előállítását, majd tisztítását, és szerkezetét igazoló analitikai vizsgálatát kellett megvalósítanunk.
2. Annak a feltételezésnek a tisztázása, hogy az allitiamin – az *Allium* nemzetségbe tartozó fajokon kívül – a paprikában is akkumulálódik-e.
3. Az allitiamin élettani hatásának vizsgálata hiperglikémiás körülmények között endothel sejt kultúrán.
4. A pozitív biológiai hatásért felelős lehetséges mechanizmusok vizsgálata.

2. Anyag és módszer

2.1. A hatóanyagok előállítása

2.1.1. A tisztított antocianin frakció

A sejtenyészési kísérletek során vizsgált TAF Dr. Homoki Judit Rita doktori munkájának eredménye és a Debreceni Egyetem Élelmiszertechnológiai Intézete bocsátotta rendelkezésemre.

2.1.2. Az Allitiamin referenciaanyag előállítása

Az allitiamin szintézisét Matsukawa és munkatársai kísérletei alapján (Matsukawa et al., 1953) – kisebb módosításokkal – valósítottuk meg. A reakcióelegyet HPLC-vel frakcionáltuk, majd a tisztított allitiamin szerkezetét MALDI-TOF MS és NMR módszerekkel validáltuk.

2.2. Az allitiamin paprikamagban való vizsgálata

A paprikamag etanolos extraktumát Strata-X-C kationcserélő oszlop segítségével frakcionáltuk, majd HPLC és HPLC/MS módszerekkel vizsgáltuk.

A kísérletekhez szükséges reagenseket a Sigma (MilliporeSigma, St. Louis, Missouri, USA) és a Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) cégektől szereztük be.

2.3. HUVEC sejtek izolálása, tenyésztése és flow citometriás karakterizálása

A bioaktív vegyületek hatását HUVEC (human umbilical vein endothelial cells: humán köldökzsínór véna endothel sejtek) sejt kultúrán végeztem. A köldökzsínórokat a Debreceni Egyetem Nőgyógyászati Klinikájáról kaptuk. A humán eredetű köldökzsínórokat érintő vizsgálatokat a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően végeztük el, a protokollt pedig a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága hagyta jóvá (regisztrációs szám: RKEB / IKEB 3712-2012). Az endothel sejteket köldökzsínór vénájából kollegenáz enzim segítségével izoláltuk, majd M199-es médiumban, 5%-os CO₂ atmoszférában és 37 °C-os hőmérsékleten Galaxy 170 R inkubátorban (Eppendorf, Hamburg, Németország) tenyésztettük.

A kórállapotok modellezésére gyulladás okozta endothel diszfunkció esetén 100 ng/ml LPS-t alkalmaztunk és 24 órás inkubációt követően vizsgáltuk a markeret, míg a hiperglikémia okozta endothel diszfunkció esetén 30 mmol/l glükózt alkalmaztunk majd 6, 12, 24 órás valamint egyhetes inkubációkat követően értékeltük az intracelluláris válaszokat.

A sejteket egerekben termeltetett fluorofórral konjugált, monoklonális antitestekkel jelöltük (FITC-CD31, PE-CD54, APC-CD106, PerCP-Cy5.5-CD45) és Becton Dickinson FACS Aria III Cell Sorter típusú flow citométer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) segítségével karakterizáltuk.

2.4. A sejtek életképességének meghatározása

Az alkalmazott hatóanyagoknak a sejtek életképességére gyakorolt hatását MTT-assay-vel vizsgáltuk és kombinált DilC₁(5)-SYTOX Green fluoreszcens jelölést alkalmaztunk. A sejteket 96 lyukú plate-re helyeztük (2x10⁴ sejt/lyuk), majd az adott hatóanyagok különböző koncentrációival kezeltük őket 24 és 48 órán keresztül a TAF, 24, 48 és 72 órán keresztül az allitiamin esetében. Az abszorbancia értékeket és a fluoreszcencia intenzitásokat Clariostar micro plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) segítségével detektáltuk.

2.5. Az intracelluláris ROS tartalom mérése

Az intracelluláris ROS tartalom mérésére a sejteket 2',7'-diklór-fluorescein-diacetát festékkel inkubáltuk 1 órán keresztül, 37° C-on, sötétben. Míg a H₂O₂-vel végzett vizsgálatok során 5 percenként monitoroztuk a sejteket – a TAF-val való kezeléseket

esetében 60. percben, az allitiaminnal történő kezelések során a 120. percben leolvasott fluoreszcencia értékekkel kalkuláltunk – addig az LPS által indukált ROS képződés vizsgálatakor 24 óra eltelte után kapott intenzitásokat használtuk fel. A fluoreszcencia intenzitásokat micro plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) segítségével detektáltuk.

2.6. Reverz transzkripció és valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció

A minták totál RNS-ét Extrazole-lal (Blirt, Gdańsk, Lengyelország) izoláltuk, amelynek minőségi és mennyiségi ellenőrzését NanoDrop-pal (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) végeztük el. A reverz transzkripciót egy 2720 Thermal Cycler típusú készüléken végeztük el (Foster City, Kalifornia, USA). A kvantitatív valós idejű PCR (Q-PCR) reakciókat egy Roche LightCycler 480 (Hoffmann-La Roche, Bazel, Svájc) készülék segítségével valósítottuk meg.

2.7. Citokin-szekréció vizsgálata Luminex/MagPlex módszerrel

A citokinek koncentrációit MILLIPLEX MAP humán citokin/kemokin mágneses panel (EMD Millipore Corp., Billerica, Massachusetts, USA) segítségével, Luminex 200 készülék (Luminex Corp., Austin, Texas, USA) segítségével határoztuk meg, a gyártó instrukciói alapján.

2.8. Glutation intracelluláris szintjének vizsgálata

A glutation koncentrációt sejtlizátumból mértük Abcam által gyártott fluorometriás glutation assay (Abcam, Cambridge, UK) segítségével a gyártó által szolgáltatott lizis puffer használata mellett valamint a gyártó instrukciói szerint.

2.9. A transzketoláz enzim aktivitásának vizsgálata

A transzketoláz aktivitást citoszol frakcióból mértük kolorimetriás módszert alkalmazva. A reakciómix 14,8 mol/L ribóz-5-foszfátot, 253 μ mol/L NADH-t, 185 U/ml triózfoszfát-izomerázt és 21,5 U/ml glicerin-3-foszfát-dehidrogenázt tartalmazott Tris pufferben (pH=7,9). A módszer lényege, hogy a reakciómixben lévő NADH mennyiségének változása arányos a minta transzketoláz aktivitásával. Az abszorbancia értékek monitorozásával és a Lambert-Beer törvény alkalmazásával értékeltük az enzimaktivásokat a NADH extinkciós együtthatóját használva (Berrone et al., 2006).

2.10. ELISA assay-k

Az AGEs mennyiségét OxiSelect kompetitív ELISA kitek segítségével, a gyártó protokollját követve határoztuk meg (Cell Biolabs Inc., San Diego, California, USA). Az aktivált NF- κ B-t Human InstantOne™ NF κ B p65 (Total) ELISA kittel (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornia, USA) kvantifikáltuk, a gyártó instrukciói alapján. A tPA TxA₂ és PGI₂ fehérjék szekrécióját a sejtek felülúszójából Abcam által gyártott kolorimetriás ELISA kitek (Abcam, Cambridge, UK) segítségével határoztuk meg, a gyártó instrukciói alapján.

2.11. Statisztikai analízis

A statisztikai analízisekhez One-Way variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk Bonferroni szerint módosított t-teszttel kiegészítve.

3. Eredmények

3.1. A hatóanyagok analitikai vizsgálata

3.1.1. A tisztított antocianin frakció

Méréseink alapján a TAF fő antocianin komponensei a cianidin-3-*O*-glükozil-rutinozid, a cianidin-3-*O*-glükozid és a cianidin-3-*O*-rutinozid.

3.1.2. Az allitiamin

3.1.2.1. *Az allitiamin szintézise*

Az allitiamint a kémiai úton történő szintézis során termelődött melléktermékektől folyadékkromatográfiás módszerrel elválasztottuk, tisztítottuk. Az egyes csúcsok frakcióit összegyűjtöttük és a szerkezetükre vonatkozó MALDI-TOF MS és NMR vizsgálatokat végeztünk. Mindkét módszer egyértelműen igazolta, hogy a kromatográffal tisztított vegyület az N-[(4-amino-2-metil-pirimidin-5-il)-metil]-N-[(2E)-5-hidroxi-3-(prop-2-én-1-ildiszulfanil) pent-2-én-2-il] formamid, azaz allitiamin.

3.1.2.2. *A paprikamag kivonat HPLC- MS vizsgálata*

A paprikamag etanolos kivonatát HPLC-MS módszerrel vizsgáltuk, amely során megállapítottuk, hogy a paprika mag akkumulálja az allitiamint.

3.2. Az endothel sejtek flow citometriás fenotipizálása

Tekintettel arra, hogy kísérleteink során primer sejtekkel dolgoztunk – nem pedig kereskedelmi forgalomból beszerezhető, a gyártó által karakterizált sejtvonalakokkal – *in vitro* vizsgálatainkat a sejtek fenotipizálásával kezdtük. A sejtmembránon kifejeződő pozitív és negatív markerfehérjéket (CD54; CD31; CD45; CD106) specifikus antitestekkel jelöltük, majd áramlási citometria segítségével karakterizáltuk az endothel sejteket. Az adatok az izolálás hatékonyságát és pontosságát igazolják és hitelesítették a további HUVEC-kel végzett vizsgálatokhoz.

3.3. A TAF hatása az LPS okozta inflammatorikus folyamatokra

3.3.1. A TAF optimális koncentrációjának meghatározása

3.3.1.1. Életképességi vizsgálatok

A hatóanyagok *in vitro* vizsgálatának első lépéseként meghatároztuk a TAF koncentrációtartományát, amely a sejtek életképességét nem befolyásolja szignifikánsan. MTT assay-t és – annak érdekében, hogy kizárjuk a korai apoptotikus és nekrotikus események lehetőségét – kombinált DiC₁(5)-SYTOX Green fluoreszcens jelölést alkalmaztunk. Megállapítottuk, hogy a TAF 1-100 µg/ml koncentrációtartományban nem fejt ki negatív biológiai hatást a sejtek életképességére 24 és 48 órás mintavétel esetén sem.

3.3.1.2. A TAF antioxidáns kapacitása

A TAF optimális koncentrációjának meghatározása érdekében további kísérleteket végeztünk, hogy kizárjuk azokat a koncentrációkat, amelyek már nem jelentenek szignifikáns antioxidáns hatást. A sejtek életképességét szignifikánsan csökkentő 500 és 1000 µg/ml-es koncentrációjú TAF-t ezekben a kísérletekben nem használtuk. A sejteket H₂O₂-vel kezeltük, amelynek következtében 60 perc elteltével ROS mennyisége a sejtekben közel négyszeresére emelkedett. Ezt a növekményt az 50 és 100 µg/ml koncentrációjú TAF volt képes a leghatékonyabban mérsékelni. Mivel a hatóanyag 50 µg/ml koncentrációban is képes volt a H₂O₂ által kiváltott ROS termelődés jelentős részének – majd egészének – eliminálására, a további kutatásainkhoz ezt a koncentrációt használtuk.

3.3.2. A TAF enyhíti az LPS által előidézett oxidatív stresszt

Az oxidatív stressz jellemzésére általánosan használt módszer a reaktív oxigén gyökök és a glutation (GSH) szint változásának mérése. Az LPS több mint kétszeres ROS produkciót eredményezett tenyészetünkben a kontrollhoz viszonyítva, amit a TAF képes volt szignifikánsan csökkenteni. Bár önmagában az LPS nem változtatta, a hozzáadott TAF szignifikánsan emelte a GSH szintjét. Mindezek a TAF-hoz köthető antioxidáns kapacitás erősítését jelzik.

3.3.3. A TAF antiinflammatorikus hatása

Az inflammáció kardinális része – az összetett folyamat indításának, időbeli és térbeli behatárolásának, a résztvevő sejtek szabályozásának eszköze – a különböző auto- para-endokrin molekuláknak az adott scenárió (bakteriális betolakodó, szövetsérülés stb.) szerinti termelése (Chen et al., 2017). Kísérleteink következő lépésében azt vizsgáltuk, hogy a TAF az LPS kiváltotta citokin és kemokin szekréciót miképpen befolyásolja. Az IL-6, IL-8, TNF- α , RANTES, GM-CSF és tPA HUVEC modellben termelődött mennyiségeinek vizsgálatával az endotheliumot érintő inflammatorikus folyamatokról kívántunk átfogó képet alkotni. A szekretált citokinek koncentrációját 24 órás kezeléseket követően a sejtek felülúszójából határoztuk meg. A TAF szignifikánsan csökkentette az LPS kezelést követő fokozott citokin felszabadulást.

3.3.4. A TAF hatása az eikozanoidok szintézisére

A gyulladás szabályozásában alapvető fontosságú fehérjék – citokinek, kemokinek – mellett a gyulladás lokális szabályozásában fontos szerepet töltenek be az arachidonsav származékai, az eikozanoidok is (Imig, 2020). Gyulladásos modellünkben megvizsgáltuk a TxA₂ valamint a PGI₂ szintjeit. A TAF jelentősen befolyásolta a PGI₂ szintjét, míg a TxA₂ szekréciója nem változott meg szignifikáns mértékben.

A PGI₂ koncentráció emelkedésének gátlása a gyakorlatban többféleképpen is megvalósulhat (szintetizáló enzimek tanszkripciójának csökkenése, poszttranszlációs modifikálása, direkt gátlása stb). Méréseink szerint a szintetizáló enzimek (a COX-1, a COX-2 és a PGI₂ szintáz) génjeinek expressziója változik. Ez mind LPS (nő) mind TAF (csökken) hatására a vizsgált specifikus mRNS alapján transzkripció szinten érvényesül.

3.4. Az allitiamin hatása a hiperglikémia által kiváltott endotheliális diszfunkcióra

3.4.1. Az allitiamin optimális koncentrációjának meghatározása

Az allitiamin antihiperglikémiás hatásait szintén HUVEC modellben vizsgáltuk. Az allitiamin esetében először a sejtek életképességére gyakorolt hatását értékeltük MTT-assay és DilC₁(5) és SYTOX Green fluoreszcens jelölés alkalmazásával. A HUVEC-et különböző koncentrációjú allitiaminnal (0,1-50 µg / ml) kezeltük 24, 48 és – tekintettel a további kísérletek során megvalósuló hosszabb távú inkubációkra – 72 órán keresztül monitoroztuk a sejteket. A legmagasabb allitiamin koncentráció, ami még nem csökkentette a sejtek viabilitását 5 µg/ml volt mindegyik mintavételi időpontban.

3.4.2. Az allitiamin csökkenti az AGEs képződését

Kísérleteinkben az endothel sejteket tartósan magas – de diabetesben előforduló – glükóz koncentrációnak (30 mmol/l) kitéve modelleztük a krónikus hiperglikémiát. A perzisztens hiperglikémia az élő sejtekben AGEs (advanced glycation end-products: késői glikációs végtermékek) fokozott kialakulását idézi elő. Az allitiamin hatóanyagra vonatkozó vizsgálatokat az AGEs szintek értékelésével kezdtük egynapos és egyhetes magas cukor koncentrációnak való kitétséget követően. Egy hetes inkubációt követően 30 mmol/l glükóz megemelte az AGEs szintjét az endothel sejtekben. A hiperglikémia által kiváltott majdnem kétszeres növekedést az allitiamin szignifikáns mértékben képes volt gátolni.

3.4.3. Az allitiamin befolyásolja a hiperglikémia okozta inflammatorikus folyamatokat

Annak érdekében, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a hiperglikémia okozta celluláris eseményekbe olyan markerfehérjéket kerestünk, amelyek expresziós szintjében rövidtávon is változás következik be hiperglikémiás környezetben. Számos tanulmány közölte a hiperglikémia és az endothelium gyulladáshoz való válasza közötti szoros kapcsolatot (Funk et al., 2012; Hoffman, 2015). Ennél fogva a hiperglikémia során aktiválódó gyulladáshoz vezető folyamatokban fontos szerepet játszó NF-κB transzkripciós faktor aktivációját értékeltük 6 és 12 órás hiperglikémiás inkubáció elteltével HUVEC sejtlizátumában. Megállapítottuk, hogy a hiperglikémiás állapot már korai szakaszban aktiválta az NF-κB-t, amit az allitiamin képes volt szignifikánsan csökkenteni. Kísérleteink következő lépésében a TNF-α, IL-6 és IL-8 citokinek felszabadulását mértük

a sejtek felülúszójából 6, 12, 24 órás inkubálást követően. Míg az IL-6 szekréciója az összes mintavételi idő alatt szignifikánsan megnövekedett a 30 mmol/l-es kezeléseket követően, addig a TNF- α szekréció jelentősen csak 6 és 12 óra után. 24 órát követően nem szignifikáns, de markáns biológiai változást figyeltünk meg. Az IL-8 szekréció 6 és 24 óra inkubáció után egyaránt statisztikailag jelentősen emelkedett. Az allitiamin minden mintavételi időpontban képes volt a fokozott citokin felszabadulást szignifikánsan mérsékelni.

3.4.4. Az allitiamin pozitív biológiai hatásának feltételezett eredete

3.4.4.1. *Az allitiamin nem fokozza a transzketoláz enzim aktivitását*

Felvetődik a kérdés, az allitiamin fentiekben bemutatott pozitív hatásai mögött milyen molekuláris hatásmechanizmus áll. Azt feltételeztük, hogy az allitiamin képes a benfotiaminhoz hasonlóan (Hammes et al., 2003) aktiválni a transzketoláz enzimet. Ezért megvizsgáltuk tenyészetünkben, hogy az allitiamin képes-e ezen hatások gyakorlására. Az allitiamin nem befolyásolta szignifikánsan, míg a benfotiamin majdnem kétszeresére növelte a transzketoláz aktivitást. Az eredmények értelmében az allitiamin pozitív hatásai függetlenek a transzketoláz enzim aktivációjától.

3.4.4.2. *Az allitiamin erős antioxidáns kapacitással rendelkezik*

A benfotiamin esetében leírtak a transzketoláz aktivitás fokozástól független mechanizmusokat (Balakumar et al., 2010) köztük antioxidáns hatásokat (Schmid et al., 2008). Ugyanígy ismert a szakirodalomban a fokhagyma azon kénvegyületeinek erős antioxidáns kapacitása, melyek allil-diszulfid molekularésszel rendelkeznek (ajoene, S-allil cisztein, stb.) (Jang et al., 2017; Kay et al., 2010; Lu et al., 2017). Mindezeket figyelembe véve, megvizsgáltuk az allitiamin ROS elimináló képességét. Az allitiamin a H₂O₂ okozta fokozott ROS-termelést szignifikáns mértékben képes volt csökkenteni, ami az allitiamin erős antioxidáns tulajdonságát igazolja.

4. Az értekezés új tudományos eredményei

Kísérleteink során egyfelől *in vitro* modellrendszerben különböző hatóanyag vizsgálatokat valósítottunk meg, másfelől műszeres analitikai vizsgálatokat alkalmaztunk az allitiamin paprikamagból való identifikálásához. A dolgozatban bemutatott, alapvetően két különböző metodikára (*in vitro* kísérletek, hatóanyagok analitikájára vonatkozó vizsgálatok) épült kísérletek új tudományos eredményei három pontban összegezhetők.

1. A meggy antocianinjaival végzett kísérletek alapján megállapítottuk, hogy a TAF 50 µg/ml-es koncentrációban enyhíti az oxidatív stresszt: ROS (73,9%; $p < 0,005$), GSH (97% $p < 0,0001$). Továbbá csökkenti az LPS indukálta fokozott proinflammatorikus citokinek szekrécióját: IL-6 (33,4%; $p < 0,01$), IL-8 (48,1%; $p < 0,005$), TNF- α (52,8% $p < 0,005$), RANTES (35,9%; $p < 0,005$), GM-CSF (51,6%; $p < 0,0001$), pozitívan befolyásolja a tPA szintjét (43,6%; $p < 0,0001$), valamint a PGI₂ szintézisében résztvevő enzimek expresszióját: PGI₂-szintáz (70,5%; $p < 0,005$), COX-1 (50%; $p < 0,01$), COX-2 (52,3% $p < 0,001$) LPS által kiváltott gyulladás HUVEC modelljén. Ezek alapján feltételezhető a TAF pleiotróp hatása, amely során egyaránt érvényesülhet antioxidáns, gyulladáscsökkentő, vazóaktív és hemosztázis-moduláló szerepe akut gyulladás esetén.
2. Az allitiamin „kápia” paprika magjában való kimutatásával az *Allium* nemzetség tagjain kívüli előfordulását elsőként igazoltuk. A paprikamag analitikai vizsgálatához kapcsolódó kísérleteink ezen kívül hozzájárulnak a paprikamag kémiai összetételének pontosabb megismeréséhez is.
3. Az allitiamin biológiai aktivitását hiperglikémiás körülmények között HUVEC sejtkultúrán vizsgáltuk. Kísérleteink során igazoltuk, hogy az allitiamin 5 µg/ml-es koncentrációban csökkenti a hiperglikémia okozta fokozott: AGEs képződést (7 nap 43,9%; $p < 0,0001$), az NF- κ B aktivációt (6 óra: 53,5%, $p < 0,0005$; 12 óra 45,3% $p < 0,005$), a proinflammatorikus citokinek szekrécióját: IL-6 (6h: 56,5%, $p < 0,01$; 12h: 34,6%, $p < 0,01$; 24h: 47%, $p < 0,01$), IL-8 (6h: 43,2%, $p < 0,0001$; 12h: 22,9%, $p < 0,01$; 24h: 34,1%, $p < 0,01$), TNF- α (6h: 72,2%, $p < 0,005$; 12h: 60%, $p < 0,005$; 24h: 61,5%, $p < 0,05$). Bizonyítottuk, hogy a megfigyelt hatások nem a transzketoláz enzim aktivációjához, hanem a vegyület antioxidáns hatásához köthetők.

5. Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága

Vizsgálataink alap kutatás jellege folytán, bár eredményeink magunkban hordozzák a későbbi hasznosíthatóságot, csak mértékkel extrapolálhatunk a gyakorlati alkalmazhatóság vonatkozásában. További állati és humán vizsgálatok eredményei alapján ítélni meg objektíven hatóanyagaink gyakorlati jelentősége.

Mindazonáltal vizsgálatainkban bizonyítottuk:

1. A TAF az endothelium gyulladásos patofiziológiai folyamatait potensen képes befolyásolni, pozitív effektusa inflammációs endothel diszfunkciókban hasznosítható.
2. Tekintettel arra, hogy elsőként vizsgáltuk ilyen konstellációban az allitiamint, eredményeink hozzájárulnak ennek a viszonylag kevésbé kutatott vegyületnek a jobb megértéséhez, különös tekintettel a hiperglikémiára gyakorolt jótékony hatásaira.

In vitro vizsgálataink eredményei alapján mind a TAF, mind az allitiamin potenciálisan alkalmas lehet az endothel diszfunkcióval összefüggő megbetegedések kiegészítő terápiájára.

3. Az allitiaminhoz kapcsolódó analitikai vizsgálataink során igazoltuk laborléptékben működő, tiszta allitiamin gyártás módszerének működőképességét, ami alapul szolgálhat nagyobb volumenű előállítás esetén. Az allitiamin paprikamagban való azonosítása tágította ismereteinket egy többnyire élelmiszeripari hulladékként kezelt növényi rész kémiai összetételét, potenciális táplálkozásbiológiai értékét illetően, ezzel nyomatékosítva élelmiszereink kvalitatív analízisének fontosságát, az abból nyerhető, felbecsülhetetlen új információ, tudás forrásaként.

6. Irodalomjegyzék

- Balakumar P., Rohilla A., Krishan P., Solairaj P., Thangathirupathi A. (2010) The multifaceted therapeutic potential of benfotiamine. *Pharmacological Research* 61:482-8. DOI: 10.1016/j.phrs.2010.02.008.
- Chen L., Deng H., Cui H., Fang J., Zuo Z., Deng J., Li Y., Wang X., Zhao L. (2017) Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9:7204-7218. DOI: 10.18632/oncotarget.23208.
- Funk S.D., Yurdagul A., Jr., Orr A.W. (2012) Hyperglycemia and endothelial dysfunction in atherosclerosis: lessons from type 1 diabetes. *International Journal of Vascular Medicine* 2012:569654-569654. DOI: 10.1155/2012/569654.
- Hammes H.-P., Du X., Edelstein D., Taguchi T., Matsumura T., Ju Q., Lin J., Bierhaus A., Nawroth P., Hannak D., Neumaier M., Bergfeld R., Giardino I., Brownlee M. (2003) Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nature Medicine* 9:294-299. DOI: 10.1038/nm834.
- Hoffman R.P. (2015) Hyperglycemic endothelial dysfunction: does it happen and does it matter? *Journal of Thoracic Disease* 7:1693-1695. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.10.24.
- Imig J.D. (2020) Eicosanoid blood vessel regulation in physiological and pathological states. *Clinical Science (London)* 134:2707-2727. DOI: 10.1042/cs20191209.
- Jang H.-J., Lee H.-J., Yoon D.-K., Ji D.-S., Kim J.-H., Lee C.-H. (2017) Antioxidant and antimicrobial activities of fresh garlic and aged garlic by-products extracted with different solvents. *Food Science and Biotechnology* 27:219-225. DOI: 10.1007/s10068-017-0246-4.
- Kay H.Y., Won Yang J., Kim T.H., Lee D.Y., Kang B., Ryu J.H., Jeon R., Kim S.G. (2010) Ajoene, a stable garlic by-product, has an antioxidant effect through Nrf2-mediated glutamate-cysteine ligase induction in HepG2 cells and primary hepatocytes. *Journal of Nutrition* 140:1211-9. DOI: 10.3945/jn.110.121277.
- Lu X., Li N., Qiao X., Qiu Z., Liu P. (2017) Composition analysis and antioxidant properties of black garlic extract. *Journal of Food and Drug Analysis* 25:340-349. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.05.011..
- Matsukawa T., Yurugi S., Matsuoka T. (1953) Products of the reaction between thiamine and ingredients of the plants of *Allium* genus: detection of allithiamine and its homologs. *Science* 118:325-7. DOI: 10.1126/science.118.3064.325.
- Schmid U., Stopper H., Heidland A., Schupp N. (2008) Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 24:371-7. DOI: 10.1002/dmrr.860.

7. Publikációs jegyzék



**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/63/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Biró Attila
Doktori Iskola: Kerpely Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10067542

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Magyar nyelvű könyvrészletek (1)

1. **Biró, A.**, Homoki, J., Pesti-Asbóth, G., Horváth, B., Cziáky, Z., Máthé, E., Gálné Remenyik, J.:
Természetes eredetű antioxidánsok.
In: A fizioterápia dilemmái. Szerk.: Sandra Sándor, San-Ergonómia Kft., Budapest, 177-217,
2017. ISBN: 9786158081603

Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (2)

2. **Biró, A.**, Markovics, A., Stündl, L., Gálné Remenyik, J.: Effect of anthocyanin-rich sour cherry extract on the level of IL-8 in LPS-induced endothelial cell.
Agrártud. Közl. 2, 27-30, 2020. ISSN: 1587-1282.
DOI: <http://dx.doi.org/10.34101/ACTAAGRAR/2/7101>
3. **Biró, A.**, Gálné Remenyik, J.: Effect of allithiamine on the level of hyperglycaemia-induced advanced glycation end products.
Agrártud. Közl. 2, 41-44, 2019. ISSN: 1587-1282.
DOI: <http://dx.doi.org/10.34101/actaagrar/2/3677>

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

4. **Biró, A.**, Markovics, A., Fazekas, M., Fidler, G., Szalóki, G., Paholcsek, M., Lukács, J., Stündl, L., Gálné Remenyik, J.: Allithiamine Alleviates Hyperglycaemia-Induced Endothelial Dysfunction.
Nutrients. 12 (6), 1-13, 2020. EISSN: 2072-6643.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/nu12061690>
IF: 4.546 (2019)
5. **Biró, A.**, Markovics, A., Homoki, J., Szöllösi, E., Hegedűs, C., Tarapcsák, S., Lukács, J., Stündl, L., Gálné Remenyik, J.: Anthocyanin-Rich Sour Cherry Extract Attenuates the Lipopolysaccharide-Induced Endothelial Inflammatory Response.
Molecules. 24 (19), 3427-3441, 2019. ISSN: 1420-3049.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24193427>
IF: 3.267





6. **Biró, A.**, Gál, F., Hegedűs, C., Batta, G., Cziáky, Z., Peitl, B., Stündl, L., Gyémánt, G., Gálné Remenyik, J.: Isolation of allithiamine from Hungarian red sweet pepper seed (*Capsicum annuum* L.).
Heliyon. 4 (12), 1-17, 2018. ISSN: 2405-8440.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00997>

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (1)

7. **Biró, A.**, Hegedűs, C., Gyémánt, G., Stündl, L., Paholcsek, M., Gálné Remenyik, J.: Effect of allithiamine in neuropathic pain sensation.
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, 145, 2018. ISBN: 9786061215461

További közlemények

Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (2)

8. Jevcsák, S., **Biró, A.**, Gálné Remenyik, J., Lehoczki, G., Murányi, E., Jóvér, J., Diósi, G., Sipos, P.: Műtrágyakezelés hatása a szemescirok lisztmintáinak zsírtartalmára és zsírsavösszetételére = Effect of fertilization on the fat content and fatty acid profile of sorghum flour samples.
Élelmiszer. Közl. 64 (4), 2278-2335, 2018. ISSN: 0422-9576.
9. **Biró, A.**, Kun-Nemes, A., Gálné Remenyik, J.: A meggy mag mint ipari gamma-tokoferol forrás.
Agrártud. Közl. 63, 27-33, 2015. ISSN: 1587-1282.

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

10. Markovics, A., **Biró, A.**, Kun-Nemes, A., Fazekas, M., Rácz, A. A., Paholcsek, M., Lukács, J., Stündl, L., Gálné Remenyik, J.: Effect of Anthocyanin-Rich Extract of Sour Cherry for Hyperglycemia-Induced Inflammatory Response and Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation.
Nutrients. 12 (11), 1-13, 2020. EISSN: 2072-6643.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/nu12113373>
IF: 4.546 (2019)
11. Barta, Z., Czompa, L., Rentka, A., Zöld, É., Gálné Remenyik, J., **Biró, A.**, Gesztelyi, R., Zsuga, J., Szodoray, P., Kemény-Beke, Á.: Evaluation of objective signs and subjective symptoms of dry eye disease in patients with inflammatory bowel disease.
Biomed. Res. Int. 2019, 1-9, 2019. ISSN: 2314-6133.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/8310583>
IF: 2.276





12. Kun-Nemes, A., Szöllösi, E., Stündl, L., **Biró, 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: 3.06

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,695

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,813

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, 2021.02.22.

