

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Készítette:
Homoki Judit Rita
doktorjelölt

Témavezető:
Dr. Remenyik Judit, PhD
tudományos főmunkatárs



DEBRECENI EGYETEM
Kerpely Kálmán Doktori Iskola

Debrecen
2020

1. A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLKITŰZÉSEI

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 1969-ben mutatta be az első globális térképet, amely a 12 évesek cariológiai státuszra vonatkozó dmf-t számot tartalmazta. Ezen eredmények azt igazolták, hogy az iparosodott országokban nagyfokú a fogszuvasodás prevalenciája, míg a fejlődő országokban a caries előfordulási gyakorisága alacsonyabb 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%-ának 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 táplálkozásból származó szénhidrátok bakteriális fermentációjából származó savas melléktermékek okoznak (Marsh és mts., 1999; Fejerskov és mts., 2003). Az elmúlt évtizedben a gyógynövényekből származó gyógyszerek iránti érdeklődés jelentősen megnőtt. Jól dokumentált, hogy a gyógynövények és a természetes vegyületek jelentős antibakteriális hatást fejtenek ki különböző mikroorganizmusok ellen, beleértve a kariogén és periodontális kórokozókat is. A természetes fitokemikáliák hatékony alternatívákat kínálhatnak az antibiotikumok helyett, és ígéretes megközelítést jelentenek a fogszuvasodás és egyéb szájüregi fertőzések megelőzésére és kezelésére (Yamanaka és mts., 2004.; Hevesi és mts., 2012.; Zhou és mts., 2016.; Balci Yuce és mts., 2016). Számos irodalom foglalkozik a meggy gyümölcs biológiailag aktív komponenseinek megismerésével. Ezen közleményekből ismerjük az antocianinok (Silva és mts., 2002) és a melatonin pontos szerkezetét mely igazolja a szabadgyökök eliminálásában betöltött szerepüket (Martín és mts., 2000.; Galano és mts., 2013.; Reiter és mts., 2014). A szerkezet pontos megismeréséből következik, hogy ezen antocianin struktúrák farmakológiai szempontból rendkívül aktív molekulák. Nagyszámú irodalom részletesen beszámol az antocianinok enzimekre gyakorolt hatásairól (Wang és mts., 1999; Jayaprakasam és mts., 2005; Akkarachiyasit és mts., 2010). Ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a magyarországi meggyfajtákban felhalmozódó antocianinok humán nyál amiláz aktivitásra gyakorolt hatását, valamint, hogy az antocianinok milyen hatást gyakorolhatnak a szájüregben megtalálható *Streptococcus mutans* számra és ezzel meghatározni az antocianinok szerepét a fogszuvasodás prevenciójában.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1 AZ *IN VITRO* VIZSGÁLAT SORÁN ALKALMAZOTT MÉRÉSI MÓDSZEREK

2.1.1 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.

2.1.2 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 μ , 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) készüléssel. Az extrakciós elegy 600 ml kloroformot és 300 µl 0,8 M-os Na₂HPO₄-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 rendszert 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.

2.1.3 MALDI-TOF MS

A ‘Bosnyák’ fajtakörhöz tartozó ‘VN1’ meggyfajta kivonat és HPLC frakciók egyes komponenseinek vizsgálatához tömegspektrumokat vettünk fel MALDI-TOF tömegspektrométerrel (Bruker Biflex III) pozitív ion módban. Mátrixként 2,5-dihidroxi-benzoésavat (DHB) vagy 2,3,6-trihidroxi-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.

2.1.4 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 μ l pufferhez 400 μ 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 /100 g 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

ϵ : 26900

L: kuvetta hossza (1 cm)

M: Moláris tömeg (449,2 g/mol)

D: Hígítás

V: minta térfogata (ml)

m: minta bemért tömege (mg)

2.1.5 Antioxidáns kapacitás mérése

Az egyes minták antioxidáns kapacitását fotokemilumineszcens (PCL) módszerrel határoztuk meg. A méréseket a Photochem (Analytik Jena, Németország) készülékkel végeztük. A mérések során a kapott görbét a PCLsoft (Analytik Jena AG, Jena, Germany) szoftverrel értékeltük ki.

2.1.6 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 irrevezibilis. 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 gyógyszeresedés, 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.

2.2 AZ KLINIKAI VIZSGÁLAT SORÁN ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

2.2.1 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.

2.2.2 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 ízesítőszereket (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.

2.2.3 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 dörzsolóval (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 kioldóközeg 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.

2.2.4 A nyálminták α -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 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- α -D-galaktopiranozil-maltozidot (GalG₂CNP, SORACHIM SA, Lausanne, Svájc). A kinetikai méréseket Jasco V550 típusú kétsugaras spektrofotométerrel végeztük, mely termosztálható. Reakció elegy végtérfogata 500 μ l volt melyből 200 μ l 5 mM 2-klór-4-nitrofenil-4-O- α -D-galaktopiranozil-maltozid (GalG₂CNP, SORACHIM SA, Lausanne, Svájc) szubsztrátot és 285 μ l MES puffert tartalmazott, melyet 37°C-on 5 percig inkubáltunk. A nyálmintákat (10 μ l) 1:200 arányban hígítottuk. A reakciót 15 μ 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 α -amilázaktivitást (sAA) (1 egység = μ mol/perc) a kiindulási sebesség $\Delta A/\text{min}$ értékével számoltuk.

2.2.5 Mikrobiológiai mérések

Az élő β -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 β -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, 10⁴-szeres hígítást hajtottunk végre egy II. osztályú lamináris áramlású szekrényben a környezeti szennyeződés elkerülése érdekében. Az agar lemezeket 37°C-on inkubáltuk és 5-10% CO₂-ot tartalmazó aerob körülmények között 4 napig inkubáltuk. Ezután morfológiai azonosítást végeztünk, végül

pedig a β -hemolizáló *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.

2.2.6 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 teszttel vizsgáltuk.

A két független minta t-próbáit használtuk, hogy összehasonlítsuk a kategóriák és a nyál-amilázaktivitás szintek közötti különbséget, az egyes paraméterek esetében. Pearson korrelációs koefficiens (r) alkalmazásával elemeztük a nyugalmi nyálban mért nyál amilázaktivitás értéket és a fogstátusz (DMF-T) közötti korrelációt.

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 a 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 tesztekkel használtuk. Minden statisztikai számítást a 23.0-as statisztikai csomaggal (SPSS, Chicago, IL, USA) végeztünk.

3. EREDMÉNYEK

3.1 A meggyfajták vizsgálatával kapcsolatos eredmények:

Megvizsgáltuk az egyes meggyfajták szárazanyag-tartalmát és megállapítottuk, hogy a 'VN1' fajtának a legmagasabb a szárazanyag-tartalma 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 a legnagyobb, míg az 'A' fajtának a legalacsonyabb volt az antocianin koncentrációja ($p < 0,05$).

Az általunk vizsgált öt magyarországi meggyfajta antocianin profilját ultra nagynyomású folyadék kromatográfiás technikával határoztuk meg. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy valamennyi fajtára jellemző, hogy a cianidin-3-rutinozid koncentrációja volt a legnagyobb.

A 'VN1' fajtáknak kiemelkedően magas a cianidin-3-rutinozid koncentrációja (147 mg/100g). Továbbá, a 'Cigánymeggy 59' és a 'VN1' fajtára jelentős cianidin-3-glükózid koncentráció is jellemző (58,3 mg/100g, 58,8 mg/100g) szemben a többi fajtával. Valamint, ugyanezen fajta rendkívül kis koncentrációban tartalmaz cianidin-3-glükozil-rutinozidot/ malvidin-3,5-O diglükózidot. A 'Kántorjánosi' tájfajtakörhöz tartozó fajták közül a 'Debreceni bőtermő'-nek a legmagasabb a cianidin-3-rutinozid koncentrációja (64,3 mg/100g), a cianidin-3-glükózid koncentráció jellemző (25,1 mg/100g). Valamint, ugyanezen fajta 16,3 mg/100g koncentrációban tartalmaz cianidin-3-glükozil-rutinozidot/ malvidin-3,5-O diglükózidot. Az egyszempontú varianciaanalízis alapján megállapítható, hogy a 'Bosnyák' tájfajtakörhöz tartozó 'VN1' fajta UHPLC módszerrel mért fő antocianin komponensek koncentráció átlagértéke szignifikánsan nagyobb, mint a cigánymeggy klónokhoz tartozó 'Cigánymeggy 59' és a 'Kántorjánosi' tájfajtakörhöz tartozó fajták antocianin koncentráció értékei ($p < 0,05$).

A meggy fő komponenseinek azonosítására MALDI-TOF vizsgálatot végeztünk. A vizsgálat során három fő komponenst azonosítottunk m/z értékük alapján: cianidin-3-glükozil-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 mérési eredményeink szerint az egyszempontú ANOVA alapján azt tapasztaltuk, hogy a cianidin-3-O monoglükozid és a cianidin-3-O-rutinozid vízdékony antioxidáns kapacitás átlagértékei, valamint a malvidin-3,5-diglükozid értékei szignifikáns különbséget mutattak ($p < 0,05$). A vizsgált antocianin standardok zsírdékony antioxidáns kapacitás eredményeinkről elmondható, hogy az eltérés egymáshoz képest nem volt szignifikáns ($p < 0,05$).

Megvizsgáltuk az öt magyarországi meggyfajta zsír- és vízdékony antioxidáns kapacitását fotokemiluminescens módszerrel. A vizsgált fajták közül kiemelkedően magas víz- (ACW) és zsírdékony antioxidáns kapacitás (ACL) jellemző a 'VN1', 'Cigánymeggy 59' fajtákra ($p < 0,05$).

3.2 Antocianinok és meggykivonat hatása a humán nyál amiláz aktivitásra (in vitro):

Tanulmányoztuk a meggykivonatok és egyes antocianinok gátló aktivitását humán nyál amiláz (EC 3.2.1.1) jelenlétében GalG₂-CNP szubsztráton. Elsőként igazoltuk, hogy a meggykivonatok és az egyes antocianinok μM koncentrációban képesek gátolni, meghatároztuk a gátlás típusát, melyre jellemző, hogy tisztán kompetitív módon gátol. Az egyes meggy extraktumok, illetve tiszta antocianin struktúrák jellemzésére meghatároztuk az IC₅₀ értéket. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a legnagyobb inhibíciós aktivitással a malvidin-3,5-diglükozid rendelkezik. Ezt követi a cianidin-3-glükozid, cianidin-3-rutinozid. Hasonlóképpen megvizsgáltuk az egyes meggykivonatok IC₅₀ értékét. Azt tapasztaltuk, hogy 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.

A berlini Freie University, Gyógyszerészeti Intézet, Gyógyszerészeti és Gyógyászati Kémia Tanszékről Dr. Jérémie Mortier és Dr. Gerhard Wolber 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 igazolták, hogy az általunk

vizsgált antocianinok az α -amiláz enzim -1, -2, -3 alhelyeire bekötődnek, biztosítva ezzel az inhibíciós aktivitást. A malvidin-3,5-diglükózid, szemben a cianidinekkel 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.

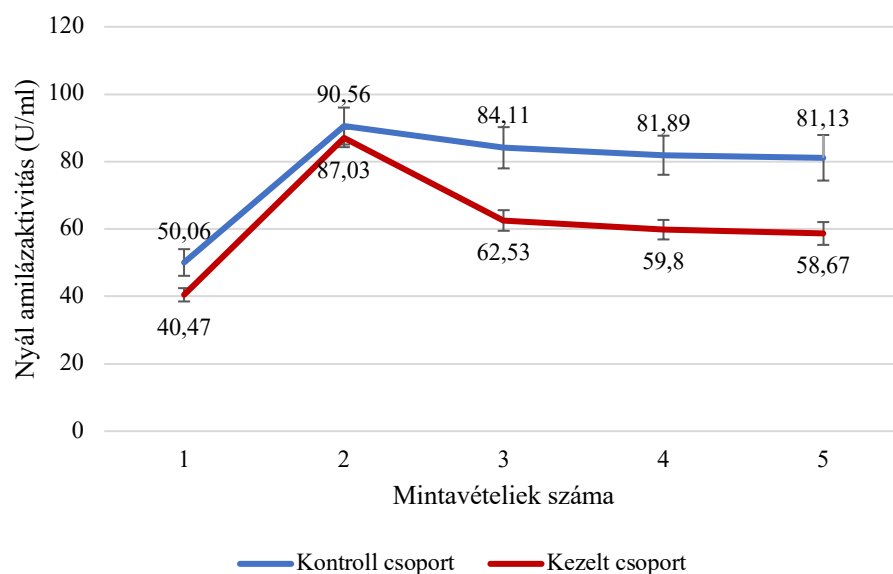
3.3 A meggykivonatot tartalmazó rágógumi nyál amilázaktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata

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 az 1. ábrán mutatjuk be és 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 α -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 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 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- , és a Cl^- koncentrációja. Mint ismeretes az α -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 Cl^- ion. Tehát az intenzív rágás hatására, kialakult inger nyál, mely biztosította az enzim számára a megfelelő környezetet a konformáció változásra, és kialakult a nyál amilázra jellemző negyedleges szerkezet. Így a második mintavételi időpontban gyűjtött nyálmintákra jellemző amilázaktivitás szignifikánsan nő mindkét csoportban. Az egytényezős ismételt mérések 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 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.



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

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.

3.4 A meggykivonatot tartalmazó rágógumi hatásának vizsgálata *Streptococcus mutans* egyedszámra

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* telepszámokat kiértékeljük, a három korcsoport valamennyi kontroll és kezelt önkénteseinél és a *S. mutans* telepszám szignifikánsan különbözött a korcsoportok között a rágást követően.

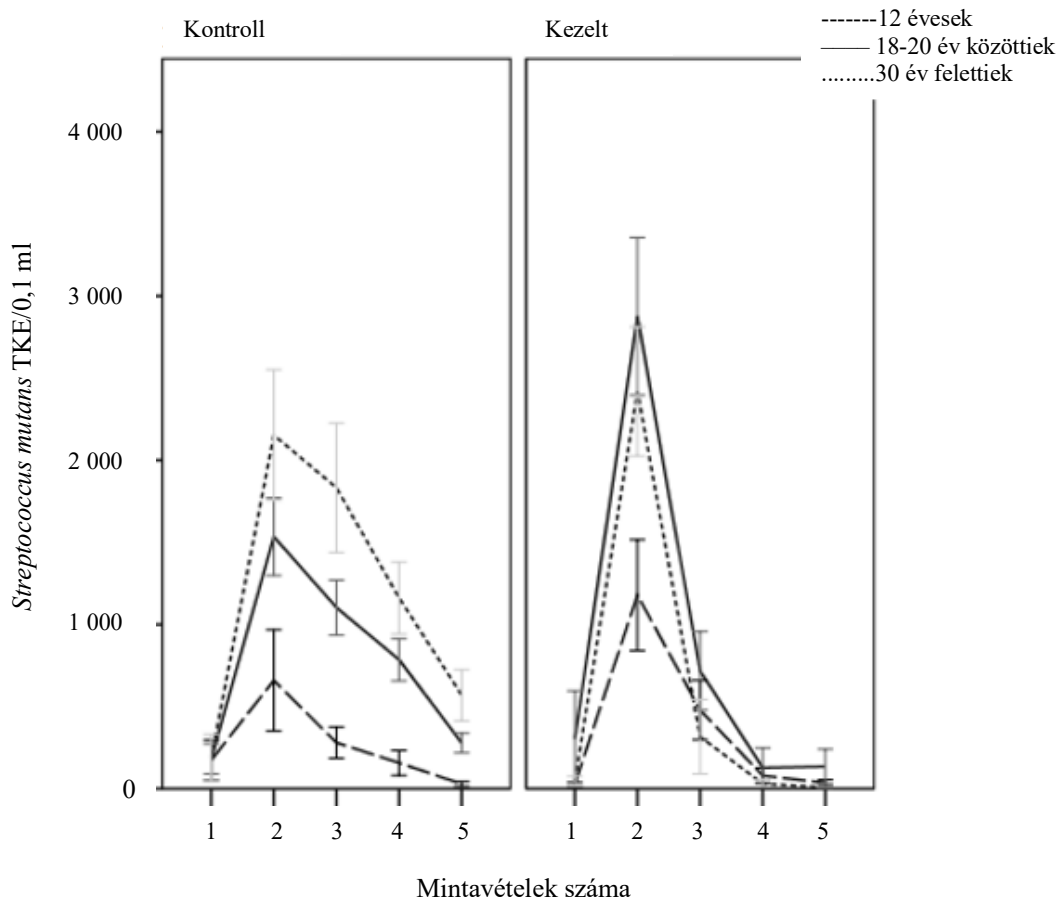
30 percen át vizsgáltuk a meggykivonatot tartalmazó rágógumi hatását a *Streptococcus mutans* számra. Eredményeinket a 2. ábrán mutatjuk be és a kontroll csoport eredményeivel hasonlítottuk össze.

A kontroll és a kezelt csoportoknál hasonlóan alacsony kezdeti *S. mutans* szint jellemző 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 adhéziora 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 adhéziója a biofilmhez. A folyamatos rágás következménye, hogy a keletkező nagymennyiségű nyál hatására 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.



2. 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 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* telepszámának 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 szájjüregi egészséget befolyásoló baktericid hatással rendelkezik (Hevesi és mts., 2012). A különbség szignifikánsan magasabb volt a stimulált nyálban. A szájszárazságnál, a rágás után a kontroll és kezelt csoportoknál egyaránt magas volt a *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. A kezelt csoportnál azt láthatjuk, hogy a 20 perctől a kategóriák közötti különbségek teljesen eltűntek.

3.5 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 kromatográfiai eljárást dolgoztunk ki, a melatonin kvalitatív és kvantitatív meghatározására. 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. Összefoglalva 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.

4. 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 μM -os koncentrációban tisztán kompetitív módon képesek gátolni a humán nyál amilázaktivitását. A tiszta antocianin struktúrák gátlás hatékonyságának jellemzésére meghatároztuk az IC_{50} (μM) értéket: cianidin-3-glükózid: 180 ± 20 , cianidin-3-rutinozid: 200 ± 24 , malvidin-3-glükózid: 675 ± 73 , malvidin-3,5-diglükózid: 80 ± 10 . Az egyes meggy extraktumok gátlás hatékonyságának jellemzésére megállapítottuk az IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) értéket: 'Cigánymeggy 59': 330 ± 45 , 'VN1': 610 ± 50 , 'A': 790 ± 55 , 'Debreceni bőtermő': 370 ± 42 , 'Kántorjánosi': 892 ± 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.

5. 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.

6. IRODALOM

1. Akkarachiyasit S., Charoenlertkul P., Yibchokanun S., Adisakwattana S.: 2010. Inhibitory activities of cyanidin and its glycosides and synergistic effect with acarbose against intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. *Int. J. Mol. Sci.* 11. 3387-3396; doi:10.3390/ijms11093387
2. 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.
3. Fejerskov O., Kidd E.A.M.: 2003. eds. Dental caries: the disease and its clinical management. Copenhagen, Denmark. Blackwell Monksgaard.
4. 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
5. Gyémánt Gy., Kandra L. Nagy V. Somsák L.: 2003. Inhibition of human salivary α -amylase by glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312. 2. 334-339.
6. 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.
7. 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
8. Marsh P., Martin M.V.: 1999. Oral Microbiology. 4th edn. Oxford: Wright.
9. 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.
10. 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.
11. Nemes A., Szöllösi 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
12. Reiter R.J., Tan D.X., Galano A.: 2014. Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. *Fortiers in physiology.* 5. 377: 1-4.doi: 10.3389/fphys.2014.00377
13. Silva M.M., Santos M.R., Caroco G., Rocha R., Justino G., Marina.L.: 2002. Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids: A Re-examination. *Free Radical Research.* 36. 11: 1219-1227.
14. 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.
15. 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.

16. 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

7. PUBLIKÁCIÓK



**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., Bíróné Molnár, P., Paholcsek, M., Váradi, J., Fenyvesi, F., Kelentey, B., Nemes, J., Gálné Remenyik, J.: Sour cherry extract inhibits human salivary α -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 sokféleségéért. 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., Biróné Molnár, 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 vizsgálatuk.
Agrártud. Közl. 52, 25-30, 2013. ISSN: 1587-1282.

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

9. Nemes, A., Szöllősi, 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: 3.098 (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 impact faktora: 15,112

**A közlő folyóiratok összesített impact 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.

