

DEBRECENI EGYETEM
KERPELY KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető:

Prof. Dr. Nagy János
egyetemi tanár, az MTA doktora

Témavezető:

Dr. Remenyik Judit
tudományos főmunkatárs

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

Készítette:

Biró Attila
doktorjelölt

Debrecen

2021

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

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

Írta: Biró Attila okleveles biomérnök

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

Témavezető: Dr. Remenyik Judit, tudományos főmunkatárs

A doktori szigorlati bizottság:

	név	tud. fokozat
elnök:	Prof. Dr. Vasas Gábor	DSc.
tagok:	Stefanovitsné Prof. Dr. Bányai Éva	DSc.
	Dr. Váradi Judit	PhD.

A doktori szigorlat időpontja: 2020. szeptember 2.

Az értekezés bírálói:

név	tud. fokozat	aláírás
.....
.....

A bírálóbizottság:

	név	tud. fokozat	aláírás
elnök:
tagok:

titkár:

Az értekezés védésének időpontja:

Tartalom

1. Bevezetés	7
2. Célkitűzés.....	9
3. Irodalmi áttekintés.....	10
3.1. A vizsgálatba vont kertészeti növények általános jellemzése	10
3.1.1. A meggy (<i>Prunus cerasus</i> L.).....	10
3.1.1.1. A meggy táplálkozásbiológiai vonatkozásai	12
3.1.2. A paprika (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	14
3.1.2.1. A paprika táplálkozásbiológiai vonatkozásai	15
3.2. A dolgozat tárgyát képező biológiailag aktív hatóanyagok	18
3.2.1. Az antocianinok	18
3.2.1.1. Az antocianinok általános jellemzése.....	18
3.2.1.2. Az antocianinok farmakológiai aktivitásának molekuláris alapjai.....	20
3.2.1.3. Az antocianinok pozitív élettani hatása különböző kórképekben	24
3.2.2. A tiamin.....	27
3.2.2.1. A tiamin általános jellemzése.....	27
3.2.2.2. A tiamin, mint esszenciális mikronutriens	30
3.2.2.2.1. A tiamin funkcióinak biokémiai alapjai	31
3.2.2.3. A tiamin szintetikus analógja a benfotiamin	34
3.3. Az endothel sejt és funkciói	35
3.4. A vizsgált kórélettani folyamatok és az endothelium	37
3.4.1. A gyulladás és az endothelium.....	37
3.4.1.1. LPS: jelátvitel és citokin burst az endothel sejtekben	37
3.4.1.2. Arachidonsav-származékok szerepe a lokális gyulladásos reakciókban.....	40
3.4.2. A hiperglikémia és az endothelium.....	43
4. Anyag és módszer	47
4.1. A tisztított antocianin frakció előállítása.....	47
4.2. Allitiamin referenciaanyag előállítása.....	47
4.2.1. Az allitiamin szintézise	47
4.2.2. Az allitiamin tisztítása HPLC-vel	48
4.2.3. A tisztított allitiamin MALDI-TOF MS vizsgálata.....	48
4.2.4. Tisztított allitiamin NMR vizsgálata	48
4.3. Az allitiamin vizsgálata a paprikamag etanolos extraktumában	49
4.3.1. A paprikamag minta előkészítése.....	49
4.3.2. A paprikamag kivonat HPLC-s vizsgálata	50

4.3.3.	A paprikamag kivonat HPLC-MS/MS vizsgálata.....	50
4.4.	HUVEC sejtek izolálása és tenyésztése	51
4.5.	Az endothel sejtek karakterizálása flow citometriás analízissel	54
4.6.	A sejtek életképességének meghatározása MTT-assay-vel.....	55
4.7.	Az apoptotikus folyamatok vizsgálata	56
4.8.	A nekrotikus események értékelése	56
4.9.	Az intracelluláris ROS tartalom mérése.....	57
4.10.	Reverz transzkripció és valós idejű kvantitatív polimeráz lánreakció.....	57
4.11.	Az indukált citokin-szekréció vizsgálata Luminex/MagPlex módszerrel	58
4.12.	Glutation intracelluláris szintjének vizsgálata.....	58
4.13.	A transzketoláz enzim aktivitásának vizsgálata	59
4.14.	ELISA assay-k	59
4.14.1.	AGEs kvantitatív meghatározása	59
4.14.2.	NF- κ B aktivitás vizsgálata	59
4.14.3.	A fehérje szekréció vizsgálata.....	59
4.15.	Statisztikai analízis.....	59
5.	Eredmények	61
5.1.	A hatóanyagok analitikai vizsgálata.....	61
5.1.1.	A tisztított antocianin frakció.....	61
5.1.2.	Az allitiamin.....	61
5.1.2.1.	Az allitiamin szintézise	61
5.1.2.2.	Az allitiamin szerkezetigazolásához kapcsolódó vizsgálatok	62
5.1.2.3.	A paprikamag kivonat HPLC és HPLC-MS/MS vizsgálata	64
5.2.	Az endothel sejtek flow citometriás fenotipizálása.....	67
5.3.	A TAF hatása az LPS okozta inflammatorikus folyamatokra.....	68
5.3.1.	A TAF optimális koncentrációjának meghatározása.....	68
5.3.1.1.	Életképességi vizsgálatok.....	68
5.3.1.2.	A TAF antioxidáns kapacitása	71
5.3.2.	A TAF hatása az LPS által előidézett oxidatív stresszre.....	72
5.3.3.	A TAF antiinflammatorikus hatása	73
5.3.4.	A TAF hatása az eikozanoidok szintézisére.....	76
5.4.	Az allitiamin hatása a hiperglikémia által kiváltott endotheliális diszfunkcióra.....	78
5.4.1.	Az allitiamin optimális koncentrációjának meghatározása	78
5.4.2.	Az allitiamin hatása az AGEs képződésére.....	80
5.4.3.	Az allitiamin hatása a hiperglikémia okozta inflammatorikus folyamatokra.....	81
5.4.4.	Az allitiamin pozitív biológiai hatásának feltételezett eredete.....	83

5.4.4.1.	Az allitiamin nem fokozza a transzketoláz enzim aktivitását	83
5.4.4.2.	Az allitiamin erős antioxidáns kapacitással rendelkezik	84
6.	Következtetések, javaslatok	86
7.	Új tudományos eredmények.....	91
8.	Gyakorlatban alkalmazható eredmények	92
9.	Összefoglalás	93
10.	Summary	95
11.	Irodalom	96
12.	Publikációk az értekezés témakörében.....	110
13.	Köszönetnyilvánítás	113
14.	Nyilatkozat	114

Rövidítések jegyzéke

AA: Arachidonsav	desorption/ionization time of light mass spectrometry)
AGEs: Késői glikációs végtermékek (Advanced glycation end-products)	MTT: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazólium-bromid
AP-1: Aktivátor protein-1	MyD88: Mieloid differenciációs faktor 88
APC:Allofikocianin	NAD ⁺ : Nikotinamid-adenin-dinukleotid
CCCP: Karbonil-cianid m-klorofenilhidrazon	NADPH: Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
CFSE: Karboxifluorescein szukcinimidil észter	NF- κ B: Nukleáris faktor-kappa B
COSY: Korrelációs spektroszkópia (correlation spectroscopy)	NMR: Mágneses magrezonancia spektroszkópia (nuclear magnetic resonance)
COX: Ciklooxigenáz	Nrf2: Nukleáris faktor-eritroid 2 kapcsolt faktor 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2)
CRP: C reaktív protein	PARP: Poli (ADPribose) polimeráz
CVD: Kardiiovaszkuláris betegségek (cardiovascular diseases)	PBS: Phosphate Buffered Saline
CYP: Citokróm P450	PDH: Piruvát-dehidrogenáz
DAG: Diacil-glicerol	PE: Fikoeritrin
DCFDA: 2',7'-diklór-fluorescein-diacetát	PECAM-1: trombocita-/endothelsejt adhesziós molekula 1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1)
DM: Diabetes mellitus (cukorbetegség)	PerCP-Cy5.5: Peridinin klorofil A protein komplex - Cy5.5 tandem fluoreszcens festék
ERK: Extracelluláris szignál által szabályozott kináz	PGF _{2a} : Prostaglandin F2 alfa
ET: Endothelinek	PGG ₂ : Prostaglandin G ₂
FAO: ENSZ Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezete (Food and Agriculture Organization)	PGH ₂ : Prostaglandin H ₂
FITC: Fluorescein-izotiocianát	PGI ₂ : Prostaglicin
GAPDH: Glicerín-aldehid-foszfát dehidrogenáz	PKC: Protein kináz C
GM-CSF: Granulocita makrofág kolónia-stimuláló faktor	PLA2: Foszfolipáz A2
HACL1: 2-hidroxiacil-CoA-liáz-1	R-5-P: Ribóz-5-foszfát
HBSS: Hank's Balanced Salts Solution	RANTES: Aktiváció hatására szabályozott, normál T-sejt-expresszált és szekretált (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)
HDL-C: Nagy sűrűségű lipoprotein koleszterin (high-density lipoprotein cholesterol)	RIPA: Radioimmunoprecipitation assay
HETE: Hidroxi-eikozatetraénsav	ROS: Reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species)
HET-P: Hidroxi-etil-tiazol-foszfát	SPE: Szilárd fázisú extrakció (solid phase extraction)
HFD: Magas zsírtartalmú étrend (high fat diet)	TAF: Tisztított antocianin frakció
HMBC: Többkötéses heteronukleáris korreláció (heteronuclear multi-bond correlation)	TGF- β : Transzformáló növekedési faktor β (Transforming growth factor beta)
HMP-PP: Hidroxi-metil-pirimidin-pirofoszfát	TH1: Tiamin-tiazol-szintáz
HPETE: Hidroperoxi-eikoza-tetraénsav	THTR: Tiamin transzporter fehérje
HPLC: Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (high performance liquid chromatography)	TLR4: Toll like receptor 4
HSQC: Heteronukleáris egykvantum koherencia (heteronuclear single quantum coherence)	TMP: Tiamin-monofoszfát
HUVEC: Humán köldökzsinór véna endothel sejtek (human umbilical vein endothelial cells)	TNF- α : Tumor nekrosis faktor alfa
ICAM-1: Intracelluláris adhesziós molekula-1 (intercellular adhesion molecule-1)	tPA: Szöveti plazminogén aktivátor
IL: Interleukin	TPK: Tiamin-pirofoszfát-kináz
KSH: Központi Statisztikai Hivatal	TPP: Tiamin-pirofoszfát
LDL-C: Alacsony sűrűségű lipoprotein koleszterin (low density lipoprotein cholesterol)	TxA ₂ : Tromboxán
LOX: Lipoxigenáz	VEGF: Vaszkuláris endothel növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
LPS: Lipopoliszacharid	VLDL-C: Nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein koleszterin (very low-density lipoprotein cholesterol)
MALDI-TOF MS: Mátrix által segített lézersedzorpációs ionizációs-repülési idő tömegspektrometria (matrix-assisted laser	XOs: Xantin oxidázok
	α -KGDH: α -ketoglutarát-dehidrogenáz

1. Bevezetés

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 (Cardenas, 2013) – Hippokratésznak 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 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, amelyekben az endothel diszfunkció központi patogenetikai tényező.

2. Célkitűzés

A Bevezetésben megfogalmazott gondolatok mentén kutatócsoportunk célja volt növényi hatóanyagok keresése, előállítása, 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 előidézett gyulladás modelljén.

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 kultúrában.
4. A pozitív biológiai hatásért felelős lehetséges mechanizmusok vizsgálata.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A vizsgálatba vont kertészeti növények általános jellemzése

3.1.1. A meggy (*Prunus cerasus* L.)

A meggy főbb botanikai jellemzői

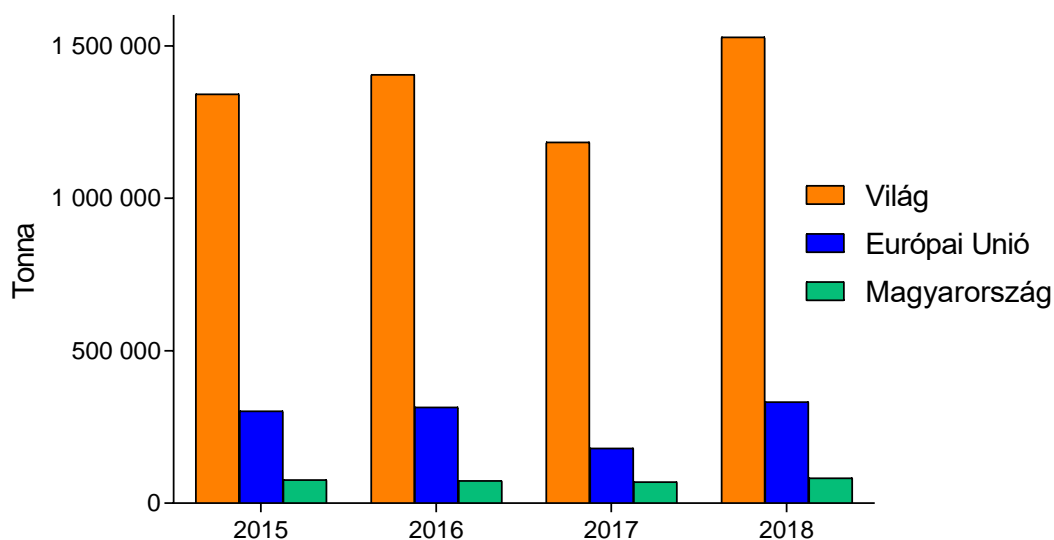
Az Ázsiából származó meggy (*Prunus cerasus* L.) taxonómiaiilag a *Rosales* rend *Rosaceae* család *Prunoideae* alcsaládjába, az alcsaládon belül a *Prunus* nemzetségbe tartozik (Hrotkó, 2003). Az utóbbi évek molekuláris genetikai vizsgálatai is bizonyították, hogy a csepleszmeggy (*Prunus fruticosa*) és a cseresznye (*Prunus avium* L.) hibridjeként jött létre (Dirlewanger et al., 2009). Alapvetően két rasszt (convarietas) és három változatsoportot (provarietas) különböztet meg az irodalom. Ezek a következők:

- Convarietas acida: lecsüngő vesszőkkel rendelkező, felkapaszkodásra hajlamos, sok gyökérsarjat nevelő cigánymeggyek, melyek húsa sötét színű.
- Convarietas vulgaris:
 - provarietas vulgaris: ide tartoznak az úgynevezett üvegmelegyek („Pándy”, „Újfehértói”, „Debreceni bőtermő” „Kántorjánosi”), melynek termése – ellentétben a cigánymeggyekkel – nem festőlevű. Halvány-piros színű, a gyümölcs húsa kemény íze kellemesen savanyú.
 - provarietas austera: hosszú, vékony kocsányokkal rendelkező édes melegyek („Latos”), melyek termése sötétvörös.
 - provarietas maraska: felálló hajtásrendszer és rövid kocsányú termés jellemezte maraszmeggyek („Bosnyák”).

Lombhullató, közepes méretű, áprilisban virágzó, június-júliusban termő növény. Rügyei hegyes tojásdad alakúak, több rügpikkellyel fedettek, a vesszőtől hegyes szögben elállók. Fűrészszélű leveleinek válla tompa vagy ék alakú, felső része elkeskenyedő, csúcsa kismértékben kihúzott. A levéllemez 4-10 cm hosszú, színe fényes sötétzöld, fonáka világosabb. A levélnyél 1-3 cm hosszú, a levél vállához közel mirigyeket visel. Csonthéjas termése 1,5-2,5 cm átmérőjű, gömbölyű. Termesztése általában a hűvösebb éghajlatú területeken terjedt el (Hrotkó, 2003).

A meggytermesztés világpiaci és hazai helyzete

A meggy legfontosabb gyümölcsünk egyike. A termesztési tradíciók, a nemesítési metodikák, amely nyomán nemzetközileg is elismert hazai fajták születtek, valamint a kedvező éghajlati adottságok révén kertészeti növényeink és ebből kifolyólag magyar mezőgazdaság meghatározó képviselője. Az árugyümölcsök sorában az alma után a második helyet foglalja el (Nyéki et al., 2005). A FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations: az ENSZ Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezete) statisztikái alapján a világ éves meggytermelése 1,2-1,5 millió tonna között változott a 2015-től 2018-ig terjedő időszakot figyelembe véve (1. ábra).



1. ábra A világ, az Európai Unió és Magyarország meggytermelésének alakulása 2015 és 2018 között. (FAO adatai alapján saját szerkesztés)

Ennek nagyjából az egyötöde származik az Európai Unióból. Az EU-ban termesztett, fogyasztásra szánt meggy közel 90 %-át három ország mezőgazdasága teremti elő, sorrendben Lengyelország (~60%), Magyarország (~25%) és Németország (~5%). Magyarország friss meggyből, meggykonzervből és fagyasztott meggyből is nettó exportőr. A frissmeggy kivitel tekintve Magyarország a világ legnagyobb exportőre. Hazánkban termesztett gyümölcsök vonatkozásban a meggy az alma utána a legnagyobb mennyiségben exportált gyümölcsféle. A hazai mezőgazdaság portfóliójában jelentős szereppel bír, ami előreláthatóan nem fog változni a következő években (Stummer, 2020).

3.1.1.1. A meggy táplálkozásbiológiai vonatkozásai

Az utóbbi években számos átfogó tanulmány született, amelyek részletesen tárgyalják a meggy által akkumulált, táplálkozásbiológiai szempontból fontos komponenseket, azok élettani hatását. A következő táblázat (1. táblázat) szemlélteti a meggy tápanyag-, vitamin és ásványi anyag tartalmát.

1. táblázat: A meggy beltartalmi értékei 100 g ehető részre vonatkoztatva, a vitaminok és ásványi anyagok esetében feltüntetve, hogy ez egy felnőtt ember számára szükséges napi beviteli érték hány százalékának felel meg ((Rodler, 2005) és a Magyar Élelmiszerkönyv 1-1-90/496 sz. előírása alapján.)

100 g meggy tápanyagtartalma		Egy felnőtt ember napi szükségletének ez hány százaléka
Energia	218 kcal	
Fehérje	0,8 g	
Zsír	0 g	
Szénhidrát	11 g	
Élelmirost	4,2 g	
100 g meggy vitamintartalma		
Karotin	0,3 mg	37,50
B1-vitamin (tiamin)	0,05 mg	4,55
B2-vitamin (riboflavin)	0,02 mg	1,43
Pantoténsav	0,08 mg	1,33
B6-vitamin (piridoxin)	0,05 µg	0,004
C-vitamin	10 mg	12,50
100 g meggy ásványi anyag tartalma		
Nátrium	4,7 mg	0,24
Kálium	186 mg	9,30
Kalcium	31,3 mg	3,91
Magnézium	15 mg	4,00
Vas	0,6 mg	4,29
Foszfor	50 mg	7,14
Réz	0,06 mg	6,00
Cink	0,142 mg	1,42
Mangán	0,05 mg	2,50
Króm	0,006 mg	15,00

A meggy tápanyagban gazdag, viszonylag alacsony kalória tartalmú gyümölcs. Alacsony szénhidrát tartalma miatt fogyasztása beilleszthető a cukorbetegség étrendjébe. Jelentős ásványianyag-tartalommal és különféle bioaktív komponenssel rendelkezik, különös tekintettel a polifenolokra, a karotinoidokra, a C-vitaminra és a káliumra. Optimális forrása a triptofánnak, a szerotoninnak és a melatoninnak is. Bioaktív vegyületeit tekintve antocianin tartalma kimagasló (Hegedűs, 2012). Kísérleteim során a meggy antocianinban gazdag extraktumát vizsgáltam, az antocianinok részletes ismertetésére a 3.2.2. fejezetben térek ki.

Számos állatokkal végzett kísérlet és klinikai tanulmány áll rendelkezésre, amelyek a meggyfogyasztásnak az élő szervezet homeosztázisára gyakorolt jótékony hatására fókuszálnak (Kelley et al., 2018). Ezek eredményeit mutatom be az alábbiakban.

Egy Dahl Salt-szenzitív (magas vérnyomásban és bal-kamra hipertrófiában szenvedő) patkányokkal végzett kísérlet igazolta, hogy a 90 napig tartó, meggyben gazdag étrend csökkenti az éhomi vércukorszintet, valamint a hiperlipidémia, a hiperinzulinémia és a zsírmáj kialakulásának kockázatát (Seymour et al., 2008). Egy másik kísérletben azt tapasztalták, hogy az eredeti meggy-sűrítvény hím CBA/Hr egerek májában és vérében gátolta a ciklooxygenáz-2 aktivitást, valamint fokozta az antioxidáns védelmi rendszer egyes enzimikus elemeit (Sarić et al., 2009). ZDF (Zucker Diabetic Fatty, diabeteses elhízott) patkánymodellekben azt is leírták, hogy az állatok étrendjébe beiktatott rendszeres meggyfogyasztás csökkentette a szisztémás és a helyi gyulladást, valamint a metabolikus szindrómában jellemző hasi elhízás kialakulásának kockázatát (Seymour et al., 2009).

Egy randomizált placebo-kontrollált crossover kísérletben azt vizsgálták, hogy a 100%-os meggy-elfogyasztása milyen hatással van a humán szérum tumor nekrozis faktor α (TNF- α), monocita kemoattraktáns protein-1, valamint a húgysav szintekre. Azt találták, hogy e markerek koncentrációjának szignifikáns csökkentésén keresztül a meggy-elfogyasztása enyhítette a gyulladás mértékét. A tanulmány szerzői azt a következtetést vonták le, hogy a meggyfogyasztás szignifikánsan csökkentheti a CVD-k (cardiovascular diseases: szív-és érrendszeri betegségek) kialakulásának kockázatát (Martin et al., 2011). Placebo-kontrollált vak crossover vizsgálatban bizonyították, hogy a meggyfogyasztás csökkenti a korai magas vérnyomásban szenvedő férfiak szisztolés vérnyomását (Keane et al., 2016). Egy randomizált kettős vak crossover vizsgálat arról számol be, hogy a meggy-elfogyasztás két héten keresztül történő rendszeres fogyasztása az inszomniában szenvedő felnőttek alvására is kedvező hatással lehet (Pigeon et al., 2010).

Továbbá azt is igazolták, hogy a meggylé rendszeres fogyasztása képes mérsékelni az intenzív testmozgás okozta izomkárosodást (Bowtell et al., 2011).

3.1.2. A paprika (*Capsicum annuum* L.)

A paprika főbb botanikai jellemzői

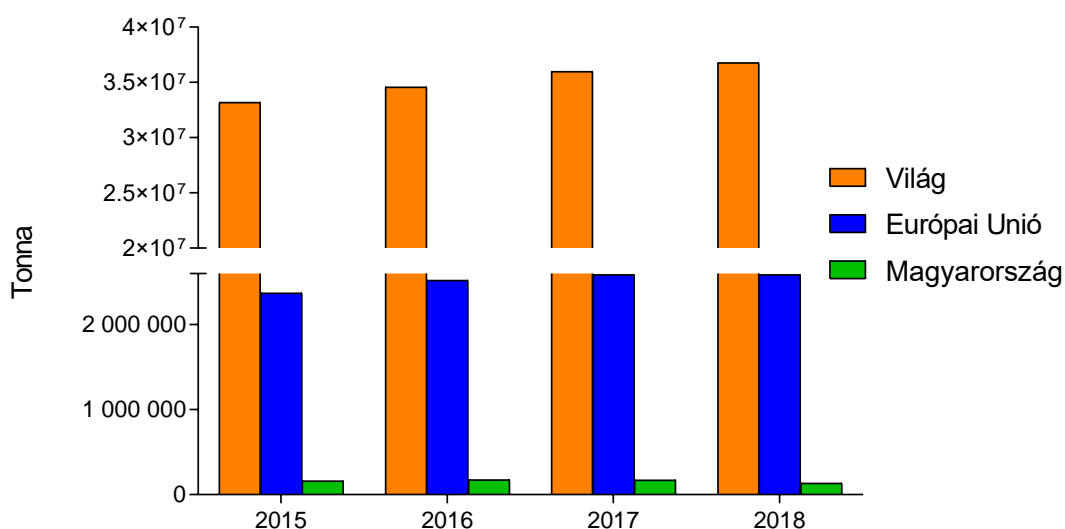
A paprika (*Capsicum* spp.) az egyik legrégebben termesztett és leggyakrabban használt haszonnövények közé tartozik, őshazája Dél-Amerika. Taxonómiailag a *Solanales* rend *Solanaceae* családjába tartozik. A *Capsicum* nemzetség több mint 200 fajt foglal magába, a termesztésbe vont fajok közül azonban csak öt nemesített faj meghatározó. Ezek a következők: étkezési paprika (*Capsicum annuum*), cserjés paprika (*Capsicum frutescens*), a kínai paprika (*Capsicum chinense*), bogyós paprika (*Capsicum baccatum*), szőrös paprika (*Capsicum pubescens*), amelyek közül Magyarországon az étkezési paprika (*Capsicum annuum* L.) terjedt el. Az éghajlati tényezőknek és az intenzív nemesítési munkáknak köszönhetően napjainkra az étkezési paprika növényi részei fajtabélyegekké váltak. A fejlett paprika gyökérzete sűrű bojthoz hasonlít, amely többnyire a talajfelszínhez közel helyezkedik el. Az étkezési paprika gyökérzete a kifejlett növény 7-17%-a. Hajtásrendszerére alul fürtös, felül bogas elágazások jellemzőek. A levelek nagysága, alakja, a levéltömeg mennyisége eltérő a különböző fajták esetén. Általános alakja tojás vagy lándzsa alakú. A levelek egyesével vagy kettesével fejlődnek. Virágai általában fehér, ritkábban sárga vagy lila színűek. Termése általában sárgás-fehér vagy zöld színű, éretten piros. A termés alakja nagyon változatos formákat vehet föl (kerek, háromszög, szarv, trapéz stb.) (Lantos, 2018).

A paprikatermesztés világpiaci és hazai helyzete

A világ paprikatermelése fokozatosan növekszik, 2018-es adatok alapján meghaladta a 36 millió tonnát. Ázsiában állítják elő a termelés közel kétharmadát. Az Európai Unió a világtermelés körülbelül 7%-áért felel. A legjelentősebb európai országok a paprikatermelés tekintetében a mediterrán országok, elsősorban Spanyolország (1,2 millió tonna), valamint a Benelux államok. Magyarországon a paprikatermesztés területe drasztikusan visszaesett az utóbbi két évtizedben, 3500 hektárról 700 hektárra. A javuló átlaghozam miatt a betakarított összes termés ehhez képest csak a negyedére csökkent. A hajtás vonatkozásában is területi csökkenés tapasztalható, noha nem olyan markáns, mint a szabadföldi termesztés esetében, 2400 ha-ról 1500 ha-ra csökkent ez a terület. A

technológiai korszerűsítés eredményeként a hozam a hajtás esetében is növekedett (FruitVeB, 2020).

A megtermelt mennyiség az utóbbi években (2015-2018) 130-170 ezer tonna a Központi Statisztikai Hivatal (KSH) adatai alapján. A 2. ábra szemlélteti a világ, az Európai Unió és Magyarország paprika termelésének volumenét 2015-2018-as időszakban, Magyarország tekintetében a KSH, a világ és az Európai Unió vonatkozásában a FAO adataira támaszkodva (2. ábra).



2. ábra A világ, az Európai Unió és Magyarország paprikatermelésének alakulása 2015 és 2018 között. (FAO és KSH adatai alapján saját szerkesztés)

3.1.2.1. A paprika táplálkozásbiológiai vonatkozásai

Az étkezési paprika energiatartalma alacsony, zsír- és szénhidrát tartalma nem számottevő. Vízben nem oldódó és – pektin formájában – vízben oldódó élelmi rostokat is tartalmaz. A paprikában megtalálható a B₁-, B₂- és B₆-vitamin, a folsav, valamint kimagasló karotinoid (A-provitamin) és C-vitamin tartalommal rendelkezik. Ásványi anyag tartalmát illetően gazdag káliumforrásnak tekinthető, mindemellett számos biológiailag aktív szekunder metabolit széles körű szintézisére képes. E tekintetben fontos említést tenni karotinoid, kapszaicinoid és polifenol tartalmáról (Lantos, 2018). A 2. táblázat (2. táblázat) szemlélteti a zöldpaprika tápanyag-, vitamin és ásványi anyag tartalmát.

2. táblázat: A zöldpaprika beltartalmi értékei 100 g ehető részre vonatkoztatva, a vitaminok és ásványi anyagok esetében feltüntetve, hogy ez egy felnőtt ember számára szükséges napi beviteli érték hány százalékának felel meg ((Rodler, 2005) és a Magyar Élelmiszerkönyv 1-1-90/496 sz. előírása alapján.)

100 g paprika tápanyagtartalma		Egy felnőtt ember napi szükségletének ez hány százaléka (%)
Energia	20 kcal	
Fehérje	11 g	
Zsír	1,4 g	
Szénhidrát	0,8 g	
Élelmirost	4,2 g	
100 g paprika vitamintartalma		
Karotin	0,4	0,05
B1-vitamin (tiamin)	50 µg	4,55
B2-vitamin (riboflavin)	30 µg	2,14
Niacin	0,2 mg	1,25
Pantoténsav	0,19 mg	3,17
B6-vitamin (piridoxin)	0,24 mg	17,14
Biotin	1 µg	2,00
Folsav	13 µg	6,50
C-vitamin	120 mg	150,00
100 g paprika ásványi anyag tartalma		
Nátrium	4 mg	0,20
Kálium	160 mg	8,00
Kalcium	14 mg	1,75
Magnézium	12 mg	3,20
Vas	0,4 mg	2,86
Foszfor	33 mg	4,71
Réz	0,05 mg	5,00
Cink	0,2 mg	2,00
Mangán	0,073 mg	3,65
Króm	0,004 mg	10,00

A paprika táplálkozásbiológiai jelentőségét illetően – ahogyan a meggy esetében is – az alábbiakban néhány releváns kutatás eredményét mutatom be.

C. annuum hipokoleszterinémias tulajdonságaira számos *in vivo* tanulmány hívja föl a figyelmet. Myung-Ja Kwon és munkatársai nyulakkal végzett kísérletükben azt tapasztalták, hogy a pirosparika szárított formában való 12 héten keresztül történő etetése csökkenti a koleszteril-észter transzfer fehérje aktivitását, továbbá az összes koleszterin (C), a triglicerid (TG), az alacsony sűrűségű lipoprotein-C (LDL-C), a nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein-C (VLDL-C) és a VLDL-TG szintjeit, míg növeli a nagy sűrűségű lipoprotein-C (HDL-C) szintet a plazmában. Ezek alapján arra a következtetésre jutottak,

hogy a pirospaprika lassíthatja az érlemeszesedés progresszióját és csökkentheti kialakulásának kockázatát (Kwon et al., 2003). Egy másik, hím Wistar patkányokon végzett tanulmány bizonyította, hogy a pirospaprika vizes kivonatának (200 mg/kg) 4 héten keresztül történő adagolása csökkentette az állatok súlygyarapodását, a szérum összes koleszterinszintjét, a trigliceridet, az LDL-C-t és az aterogén indexet, valamint növelte a szérum HDL-C szintjét (Otunola et al., 2014).

A szárított guajilló paprika karotinoidekban gazdag extraktumával végzett állatkísérletben igazolták annak fájdalomcsillapító hatását, valamint bizonyították, hogy szignifikánsan gátolja az ödéma képződését (Hernández-Ortega et al., 2012). Egy másik, hasonló jellegű *in vivo* tanulmány a *C. annuum* leveleinek etanolos kivonatát vizsgálta, amely során bizonyították, hogy a kivonatnak jelentős ízületi gyulladás csökkentő hatása van, amelynek hátterében a C reaktív protein (CRP) a TNF- α , az interleukin (IL)-1 β és az IL-6 proinflammatorikus citokinek szuppressziója állhat (Tag et al., 2014).

A cserjés paprika antidiabetikus hatására vonatkozó vizsgálatok kiemelik, hogy a *Capsicum frutescens* fokozza az inzulinérzékenységet a perifériás szövetekben, stimulálja a glukagon-szerű peptid-1 szekrécióját, javítja a glükóz toleranciát, valamint megvédi a β sejteket az apoptózistól (Roghani et al., 2004).

A paprikamag etanolos kivonatát vizsgálva Song és mtsai úgy találták, hogy az csökkentheti az oxidatív károsodást az antioxidáns védekező rendszer aktiválásával magas zsírtartalmú étrenden (HFD: high fat diet) tartott patkányok esetén (Song et al., 2010). Egy másik *in vivo* vizsgálat paprikamag extraktum potenciális preventív hatását írta le HFD-indukált obez egerekben (Sung et al., 2016).

A fentiek rávilágítanak arra, hogy a meggy és a paprika biológiailag aktív vegyületeket akkumulálnak és képesek pozitív élettani hatásokat kifejteni. Munkám során a meggy antocianinjait és a paprikamagban felhalmozódó allitiamin hatását vizsgáltam primer endothel sejt kultúrán különböző kórélettani állapotok modellezése mellett. Az alábbiakban az általam vizsgált hatóanyagokat, valamint a modellrendszerként használt endothel sejteket kívánom bemutatni a kísérletek során szimulált patomechanizmusok összefüggésében.

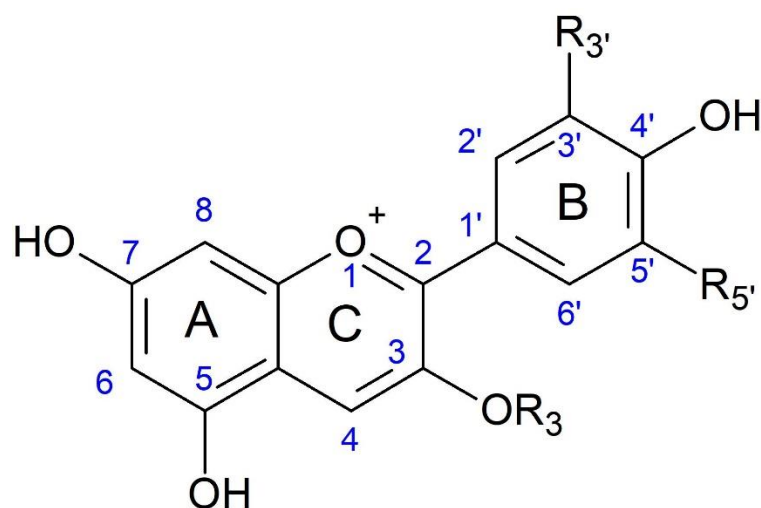
3.2. A dolgozat tárgyát képező biológiailag aktív hatóanyagok

3.2.1. Az antocianinok

3.2.1.1. *Az antocianinok általános jellemzése*

Az antocianinok a polifenolok, azon belül a flavonoidok több ezer molekulát magában foglaló vegyületcsaládjába tartoznak, a növények másodlagos anyagcseretermékei, amelyek komplex biológiai funkciókat látnak el a növényi szervezetben. Virágok és termések színárnyalataiért felelősek, rovar attraktánsként pedig fontos szerepet játszanak a hasznos beporzók figyelmének felkeltésében (Winkel-Shirley, 2001). Kulcsszerepük van a növények biotikus vagy abiotikus stresszre adott válaszreakcióiban: az antocianinok megvédik a fotoszintetikus apparátust az UV fény káros hatásától, antimikrobiális hatással rendelkeznek, ROS (reactive oxygen species: reaktív szabad gyök) elimináló képességük révén pedig képesek enyhíteni az oxidatív stresszt (Mouradov and Spangenberg, 2014). A legújabb kutatások alapján az antocianinok jótékony hatásúak az alacsony hőmérséklet, a szárazság és a magas sótartalom okozta stresszhatások esetén is (Li et al., 2017). Stabilitásuk függ a pH-tól, a fénytől, a hőmérséklettől és molekuláris szerkezetüktől (Khoo et al., 2017).

Az antocianinok és antocianidinek a fenilpropanoid anyagcsereúton szintetizálódnak (Shi and Xie, 2014). Az antocianinok esetében az alapvázhoz annak hidroxilcsoportjain keresztül glikozid kötéssel cukoregységek kapcsolódnak, ilyen módon az antocianinok az antocianidinek glikozidjai. Az antocianidinekre és az antocianinokra a C6-C3-C6 alapváz jellemző, amelyben két benzolgyűrűt egy oxigénatomot tartalmazó heterociklusos pirángyűrű köt össze (Wallace and Giusti, 2015) (3. ábra). Az alapvázban lévő kettős kötések a molekula kromofór részei, amelyek – elsősorban, de nem kizárólagosan – felelősek az antocianint felhalmozó növények különböző színárnyalataiért.



3. ábra Az antocianidinekre és az antocianinokra jellemző C₆-C₃-C₆ alapváz

3. táblázat: Néhány fontos antocianidin és glikozidjainak szerkezete

ANTOCIÁNOK	R ₃	R _{3'}	R ₅
PELARGONIDIN	H	H	H
CIANIDIN	H	OH	H
DELFINIDIN	H	OH	OH
PEONIDIN	H	OCH ₃	H
PETUNIDIN	H	OCH ₃	OH
MALVIDIN	H	OCH ₃	OCH ₃
PELARGONIDIN-3-GLÜKOZID	Glükóz	H	H
CIANIDIN-3-GLÜKOZID	Glükóz	OH	H
DELFINIDIN-3-GLÜKOZID	Glükóz	OH	OH
PEONIDIN-3-GLÜKOZID	Glükóz	OCH ₃	H
PETUNIDIN-3-GLÜKOZID	Glükóz	OCH ₃	OH
MALVIDIN-3-GLÜKOZID	Glükóz	OCH ₃	OCH ₃

Az alapvázhoz különböző szubsztituensek elsősorban hidroxil-, metoxicsoportok, cukoregységek kapcsolódhatnak, melyek száma és helyzete különbözteti meg egymástól azokat (3. táblázat: *Néhány fontos antocianidin és glikozidjainak szerkezete* Az antocianinok esetében a glikoziláció megvalósulhat az alapváz 3, 5, 7, 3' és 5' fenolos hidroxilcsoportjain, azonban a 'C' gyűrű 3. széntatomjához kapcsolódó hidroxilcsoporton történő glikoziláció a meghatározó (Cheng et al., 2014). A glikozidok nagyobb stabilitással és jobb vízzoldhatósággal rendelkeznek az aglikon formákhoz képest. A glikozilációban jellemzően részt vevő monoszacharidok a glükóz, a ramnóz, a

galaktóz, az arabinóz és a xilóz (Kähkönen et al., 2003). A diszacharidok esetében a rutinóz glikozilációhoz való hozzájárulása a leggyakoribb (Farr et al., 2019). Egyes antocianinok felépítésében triszacharidok is a részt vesznek, mint például a glükorutinóz (Cabrita, 2015). Az antocianinok glikozidos csoportját különböző szerves – elsősorban alifás dikarbon- és fenilpropán- – savak is acilezhetik (Alappat and Alappat, 2020).

3.2.1.2. *Az antocianinok farmakológiai aktivitásának molekuláris alapjai*

Az antocianinok szabad gyök elimináló képessége a legrégebben kutatott tulajdonság, amelyhez biológiai aktivitásukat sokáig kizárólagosan tulajdonították. Az elmúlt évtizedek kutatásai más mechanizmusokat is felvetnek és egyúttal rávilágítanak az antocianinok sokrétű terápiás potenciáljára (Salehi et al., 2020). Az antocianinok farmakológiai jelentőségének hiánytalan bemutatását – a tekintélyes szakirodalomra való tekintettel – ezen dolgozat keretei nem teszik lehetővé, azonban az alábbiakban ismertetem e mechanizmusok molekuláris fundamentumait, törekedve egy rövid, tömör, mindazonáltal körültekintő interpretációra.

A reaktív szabad gyökök és az ezek eliminálását végző antioxidánsok egyensúlyának eltolódása az előbbieik javára eredményezi az oxidatív stresszt, amely számos megbetegedés progressziójában játszik fontos szerepet. A szabad gyökök származhatnak endogén illetve exogén forrásból. Az élő szervezetben lejátszódó szabályozott vagy spontán oxidációs-redukációs folyamatok révén képződnek az endogén szabadgyökök enzimatis és nem enzimatis reakciókban. Legfőbb endogén forrásként említhető – a teljesség igénye nélkül – a mitokondriális elektrontranszportlánc, a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH)-oxidázok, a citokróm P450 (CYP) enzim család, a xantin-oxidázok (XOs). A szabad gyökök exogén forrásai az ionizáló sugárzás, az ultraibolya sugárzás, a dohányzás, a különböző kemikáliák stb. (Liguori et al., 2018). A szabad gyökök elleni védekezés alapfeltétele az enzimatis (glutathion-peroxidáz, szuperoxid-dizmutáz, kataláz, stb.) és nem enzimatis (aszorbinsav, α -tokoferol, α -liponsav stb.) védelmi rendszer összehangolt működése (Birben et al., 2012). Az antocianinok – és egyéb flavonoid típusú vegyületek – a nem enzimatis védelmi rendszer funkcióját támogatják (Ullah et al., 2019).

Az antocianinok **antioxidáns hatás**át vizsgáló kutatások alapján az antocianinok különböző módokon fejthetik ki aktivitásukat. Az antocianinok szerkezetére jellemző szabad -OH csoportok redukálóképességük révén képesek közvetlenül eliminálni, vagy stabilabb formává alakítani az oxidációs folyamatokban keletkező reaktív gyököket

(Khoo et al., 2017). Ebben a tekintetben a B gyűrű C3-as és C4-es, valamint a C gyűrű C3-as helyzetű szénatomjához kapcsolódó -OH csoportok bírnak kitüntetett szereppel. Az antocianinok egy vagy több fenolsavval történő acilezése jelentősen megnöveli antioxidáns aktivitásukat (Matera et al., 2015).

Az endogén reaktív oxigén gyök (ROS) képződés egyik forrása a XO működése. A purinbázisok katabolizmusából származó xantint a XO húgysavvá és H₂O₂-dá alakítja. Az antocianinok a XO enzim inhibícióján keresztül indirekt módon fejtik ki antioxidáns hatásukat (Borges et al., 2002). Egy 2000-ben megjelent tanulmány azt is kimutatta, hogy a flavonoidok C5-ös és C7-es szénatomjához kapcsolódó -OH csoport jelenléte fokozott XO-gátló hatást eredményez, míg a C6-os és C3-as szénatomhoz kapcsolódó -OH csoportok ezt gátló hatást jelentősen csökkentik (Cos et al., 1998).

Az oxidatív károsodás egyik következménye a fémtartalmú fehérjékben kötött állapotban lévő átmeneti fémionok (Fe, Cu) szabaddá válása, amelyek tovább fokozhatják a szabadgyökök okozta károsodást az ún. Fenton reakció révén (Zhao, 2019). Az antocianinok az átmeneti fémionokkal komplexet képeznek, így a fémionok Fenton-reakcióban mutatott rendkívül reaktív hidroxilgyököket generáló képessége nem jut érvényre. Ebben a tekintetben az antocianinok B gyűrűjének C3'-as és C4'-es szénatomhoz kapcsolódó -OH csoportjai játszanak fontos szerepet, amelyeken keresztül stabil antocianin-fém komplexek alakulnak ki (Schreiber et al., 2010). Fémkomplekképző sajátosságuknak köszönhetően képesek gátolni a réz ionok katalizálta LDL oxidációt is csökkentve az ateroszklerotikus plakkok kialakulásának kockázatát (Brown and Kelly, 2007).

Egy másik támadásponton az antocianinok az Nrf2 (nukleáris faktor-eritroid 2 kapcsolt faktor 2) transzkripció faktor stimulálásán keresztül támogatják a fázis II rendszer enzimeinek (glutathion-S-transferáz, NAD(P)H-kinonreduktáz, γ -glutamil-ciszteín-szintetáz, hemoxigenáz) bioszintézisét, ami kulcsfontosságú az antioxidáns védelmi rendszerben (Aboonabi and Singh, 2015).

Az antocianinok másik jelentős farmakológiai szerepe **gyulladáscsökkentő hatásukban** áll, amelyet – hasonlóan az antioxidáns képességükhöz – több molekuláris mechanizmuson keresztül képesek kifejteni. Tekintettel a szabad gyökök és az inflammatorikus folyamatok hátterében álló molekuláris történések szoros kapcsolatára (Lauridsen, 2019) fontos megjegyezni, hogy az antocianinok antioxidáns hatása önmagában hozzájárulhat a gyulladáscsökkentő képességükhöz.

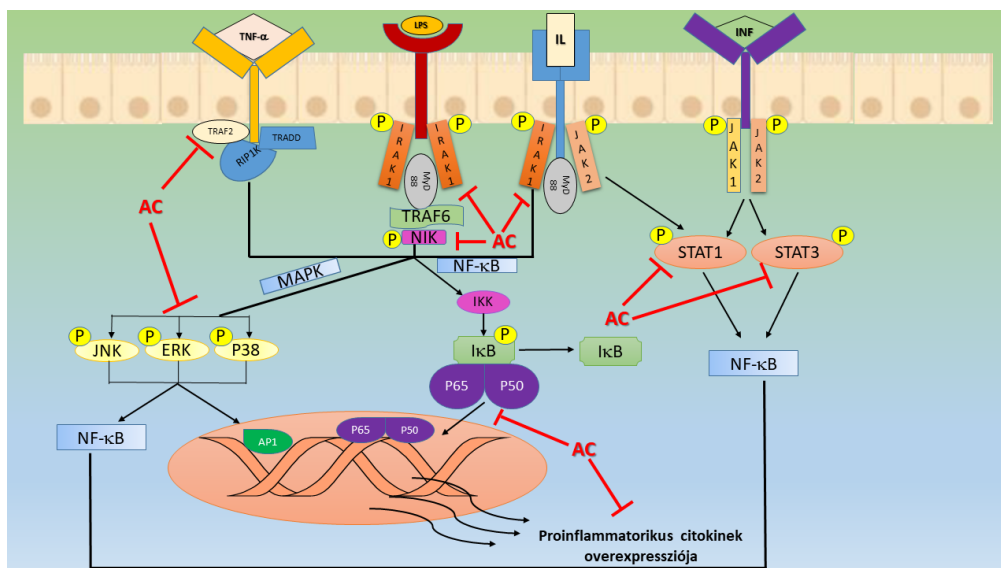
Az antocianinok antiinflammatorikus aktivitása mögött a gyulladás közvetítésében fontos szerepet játszó enzimek inhibíciója is állhat. A 3.4.2.2. fejezetben részletesen ismertetett arachidonsav útvonalon szintetizálódó eikozanoidok (prostaglandinok, leukotriének) fontos szerepet töltenek be a gyulladási reakciók regionális szabályozóiként (Lone and Taskén, 2013). A sejtmembránok foszfolipidjeiből a foszfolipáz A2 (PLA2) enzim hatására arachidonsav szabadul fel, amelyből ciklooxygenáz (COX-1-2) és lipoxigenáz (5-LOX) enzimek katalízise mellett az eikozanoidok bioszintéziséhez szükséges prekursorok keletkeznek (Khanpure et al., 2007). Dreiseitel és munkatársai arról számoltak be, hogy az antocianinok – köztük a cianidin, a malvidin, a peonidin, a petunidin és a delphinidin – hatékony inhibitorai a PLA2 enzimnek (Dreiseitel et al., 2009). Egy másik, *in vitro* vizsgálatban azt találták, hogy az antocianinok különböző mértékben képesek gátolni a COX-1 és COX-2 enzimek aktivitását. Azt is leírták, hogy a COX-2 gátlás függ az antocianinok szerkezetétől, egész pontosan a B gyűrűn lévő szabad -OH csoportok számától. Antocianinok egyetlen -OH csoporttal a B-gyűrűn (pelargonidin, a peonidin és a malvidin) nem mutattak gátló hatást. A B-gyűrűn két -OH csoportot tartalmazó cianidin erősebb gátlást mutatott, míg a leghatékonyabb inhibitornak a C₆-C₃-C₆ alapváz váz B gyűrűjén 3 -OH csoporttal rendelkező delphinidin bizonyult (Hou et al., 2005). *In vitro* enzim-inhibíciós vizsgálatban úgy találták, hogy az antocianinok nem-kompetitív módon gátolják az 5-LOX enzimet is. Ebben a tekintetben a delphinidin-3-*O*-glükózid és a delphinidin-3-*O*-galaktozid biológiai aktivitása volt a legmarkánsabb összehasonlítva más antocianinokkal illetve azok aglikonjaival (Knaup et al., 2009).

A legújabb kutatások az antocianinok transzkripciót szabályozó hatására hívják fel a figyelmet (Li et al., 2019). Az inflammatorikus ágensek (citokinek, kemokinek) külső vagy belső ingerek hatására szintetizálódnak bonyolult szignál transzdukciós folyamatok következményeként. Ezekben a jelátviteli folyamatokban kulcsfontosságú adaptermolekulák és transzkripció faktorok szabályozásán keresztül úgy tűnik az antocianinok képesek jelentős immunmoduláló hatás kifejtésére (4. ábra).

Az NF- κ B (nukleáris faktor-kappa B) egy transzkripció faktorcsalád, ami kulcsfontosságú a veleszületett és adaptív immunrendszer működésének molekuláris szabályozásában, valamint a gyulladási válaszok szubcelluláris közvetítésében (Dev et al., 2011). Paixão és munkatársai kimutatták, hogy a malvidin-3-*O*-glükózid csökkenti a proinflammatorikus mediátorok szekrécióját szarvasmarha eredetű endothel sejtekben áltál, hogy gátolja az NF- κ B aktiválódását (Paixão et al., 2012). Egy másik *in vitro*

tanulmány arról számolt be, hogy a malvidin gátolta az I κ B α (NF- κ B inhibitor) degradációját a citoszolban, valamint blokkolta a p65 alegység sejtmagba való transzlokációját (Huang et al., 2014). Egy RAW264.7 makrofág sejtekkel végzett *in vitro* kutatás leírta, hogy antocianinban gazdag fekete rizs teljes kiőrésű kivonata csökkentette az NF- κ B aktivitását. Ugyanez a tanulmány adatokat szolgáltatott az aktivátor protein-1 (AP-1) transzkripciós faktor sejtmagba való transzlokációjának gátlását illetően is. A növényi extraktum dóziszfüggő módon csökkentette MAPK-k (mitogén-aktivált protein kinázok) csoportjába tartozó ERK (extracelluláris szignál által szabályozott kináz), p38 és JNK (C-Jun N-terminális kináz) foszforilációját (Limtrakul et al., 2015). Szintén RAW264.7 immunsejtekkel végzett kutatás a peonidin, a pelargonidin, és a malvidin p-kumársavval alkotott észtereit vizsgálta. Eredményeik alapján gyulladáscsökkentő hatásukat az NF- κ B aktivitásának és a STAT1/3 (signal transducer and activator of transcription 1/3) molekulák foszforilációjának a gátlásán keresztül fejtik ki (Lee et al., 2017). IL-1 β által indukált ízületi kondrocita (porcsejtek) gyulladásos modellen végzett vizsgálatok azt is bizonyították, hogy a delfinidin képes az NF- κ B aktivációjának csökkentésére az IL-1 receptor asszociált kináz (IRAK)-1 (Ser376) foszforilációjának modulálása révén (Haseeb et al., 2013).

A bemutatott eredmények az antocianinok biológiai aktivitására vonatkozó ismereteknek csak egy szűk spektrumát képezik. Farmakológiai aktivitásuk – az eddigi kutatási eredmények alapján – több mint 100 receptor, intra- vagy extracelluláris szignál molekula, vagy transzkripciós faktor modulálásán keresztül valósulhat meg (Domitrovic, 2011; Li et al., 2019). Összességében bizonyítottnak tekinthető, hogy az antocianinok képesek kölcsönhatásba lépni az inflammatórikus és antioxidáns rendszer kulcsfontosságú elemeivel. Ezek pozitív élettani hatásai lehetővé teszik alkalmazásukat bizonyos megbetegedések prevenciójában.



4. ábra Antocianinok immunmoduláló hatásának mechanizmusai.

AC: Antocianin, **AP-1:** Aktivátor protein-1, **ERK:** Extracelluláris szignál által szabályozott kináz, **JAK:** Janus kináz, **JNK:** C-Jun N-terminális kináz, **IKK:** inhibitor κ -B-kináz, **INF:** Interferon, **IL:** Interleukin, **IRAK:** IL-1 receptor asszociált kináz, **LPS:** Lipopoliszacharid, **MAPK:** Mitogén-aktivált protein-kináz, **MyD88:** Mieloid differenciációs faktor 88, **NF- κ B:** Nukleáris faktor-kappa B, **NIK:** NF- κ B-indukáló kináz, **P38:** p38 mitogén-aktivált protein-kináz, **P50:** NF- κ B P50 alegysége, **P65:** NF- κ B P65 alegysége, **RIPK:** Receptor-kölcsönhatásban lévő szerin/treonin-protein-kináz, **STAT:** jelátalakító és transzkripció fehérjék aktivátora, **TNF- α :** Tumor nekrozis faktor alfa, **TRADD:** TNF receptorral kapcsolódó halál doménnel rendelkező protein, **TRAF:** TNF receptor asszociált factor
(Shiyu Li et al., 2019. alapján saját szerkesztés)

3.2.1.3. Az antocianinok pozitív élettani hatása különböző kórképekben

Az alábbiakban néhány állati és humán klinikai vizsgálatot mutatok be, amelyek az antocianinok farmakológiai aktivitását kihasználva az életkorral és táplálkozással is összefüggésbe hozható megbetegedések esetében értek el releváns eredményeket.

Kardiovaszkuláris hatás

A CVD-k világszerte vezető haláloknak számítanak (Mc Namara et al., 2019). Az antocianinok CVD-vel szembeni hatására számos kutatás felhívta a figyelmet (Hassellund et al., 2013; Reis et al., 2016; Wallace, 2011). C57BL/6J egerekkel végzett kísérletben igazolták, hogy a cianidin-3-O-glükózid és a delfinidin-3-O-glükózid közvetlenül gátolták a vérlemezkék aktiválódását, adhézióját és aggregációját, ezzel

gyengítették a thrombus növekedését mind artériás, mind vénás nyírófeszültségek esetén, ami valószínűleg hozzájárul az antocianinok trombózis és CVD elleni védőhatásaihoz (Yang et al., 2010). Diszlipidémiás betegeknél végzett placebo-kontrollos vizsgálatban kimutatták, hogy az antocianinok 12 héten át történő napi kétszeri bevitele csökkentette a LDL, egyúttal növelte a HDL koleszterinszintet (Qin et al., 2009). Alvarez és munkatársai hasonló eredményekre jutottak egészséges önkéntesekkel végzett kutatásukban. Napi 500 g földi eperrel történő étrendkiegészítés hatására csökkent az összkoleszterin, az LDL-koleszterin és a triglicerid szint. Szignifikánsan csökkentek az oxidatív stressz markereinek koncentrációi a vérben (malondialdehid) és a vizeletben (8-hidroxi-oxi-guanozin) (Alvarez-Suarez et al., 2014). Egy 24 éven át tartó prospektív tanulmányban azt figyelték meg, hogy a gyümölcsalapú, antocianinokban gazdag étrend a nem halálos miokardiális infarktus és az ischaemiás stroke alacsonyabb kockázatával társult (Cassidy et al., 2016). Egy másik hosszú időtartamú (18 év) nyomon követéses klinikai vizsgálat 93 600 nő bevonásával bizonyította, hogy az áfonya és szamóca heti három alkalommal történő bevitele szignifikánsan (34 %-kal) csökkenti az akut miokardiális infarktus kialakulásának kockázatát. A szerzők következtetése alapján ennek hátterében az antocianinok védő hatása állhat, ugyanakkor az antocianin bevitel a stroke bekövetkezésének gyakoriságára nem volt hatással (Cassidy et al., 2013). 45 randomizált, kontrollált tanulmány metanalízise arra a következtetésre jutott, hogy a piros bogyósok fogyasztása, valamint tisztított antocianinok napi bevitele (2,2–1230 mg antocianin/nap) jelentősen megnöveli a HDL-koleszterinszintet, ezzel párhuzamosan csökkenti az LDL-koleszterint, a triglicerid szintet, a szisztolés és a diasztolés vérnyomást, valamint a CRP és TNF- α gyulladásos markerek szintjét a vérben (Luis et al., 2018).

Antidiabetikus és antiobezitás hatások

A diabetes mellitus (DM) egy krónikus metabolikus rendellenesség, amely jellegzetesen megváltoztatja a szénhidrát-, zsír- és kisebb mértékben a fehérjeanyagcserét. Ennek oka a hasnyálmirigy β -sejtjeinek rendellenes működéséből adódó inzulinszekréció csökkenése esetleg teljes hiánya, vagy az esetek nagyobb hányadában a megtermelt inzulin hatásának csökkenése (inzulinrezisztencia) (American Diabetes, 2010). A testtömeg-index szoros kapcsolatban áll az inzulinrezisztencia kialakulásával. Elhízás esetén megnő a szabad zsírsavak, a glicerin, egyes hormonok,

citokinek és más gyulladási markerek mennyisége, amelyek fontos szerepet játszanak az inzulinrezisztencia patogenezisében és progressziójában (Bays et al., 2007).

Az antocianinok a lipidek felszívódásának gátlásával, az energiafelhasználás befolyásolásával, a lipid anyagcsere szabályozásával, a fent részletezett antiinflammatorikus hatással, a humán mikrobiom diverzitásának javításával, valamint a táplálékbevitel idegi szabályozásával jótékony hatással lehetnek az elhízás tüneteire (Xie et al., 2018). Kwon és munkatársai leírták, hogy az antocianinokban gazdag fekete szójabab kivonat HFD-n tartott patkányok esetén csökkentette a testtömeg-növekedést. Emellett csökkent a szérum triglicerid és koleszterin szintje, míg a HDL koncentrációjában növekedés volt megfigyelhető (Kwon et al., 2007). Egy másik *in vivo* kísérletben ICR egerek HFD-jét lila édesburgonya antocianin extraktumával egészítették ki napi 200 mg/kg dózisban négy héten át, ami csökkentette a súlygyarapodást, emellett javította a szérum lipid paramétereit és gátolta a máj triglicerid felhalmozását. Az antocianin frakció fokozta az adenosin-monofoszfát aktivált protein kináz foszforilációját illetve csökkentette a szterin szabályozó elemhez kötődő fehérje 1 expresszióját, ami végeredményben csökkentette az acetyl-CoA karboxiláz és zsírsav-szintáz enzimeket kódoló gének kifejeződését az egerek májában (Hwang et al., 2011).

Az antocianinok az intesztinális glükózfelszívódás gátlásával, a hasnyálmirigy inzulinszekréciójának stimulálásával, a 4. típusú glükóz transzporter expressziójának fokozásával, valamint a májbeli glükoneogenezis mérséklésével enyhíthetik a DM szövődéseit (Belwal et al., 2017). Heyman és munkatársai 8 különböző, flavonoidokban gazdag bogyós gyümölcs hatását vizsgálták 13 héten keresztül HFD-n tartott C57BL/6J egerek esetében. Megállapították, hogy az antocianinban gazdag étrend alacsonyabb éhomi inzulinszintet eredményezett, valamint pozitív hatást gyakorolt a glükóz homeosztázisra és a hepatikus lipid lerakódásra (Heyman et al., 2014). Diabetikus patkányokban a szőlő antocianinjairól bizonyították, hogy a kezelést követően csökkentik a vizelet és a szérum glükóz koncentrációját (Jankowski et al., 2000).

Meg kell említeni az antocianinok rákellenes (Lin et al., 2017), antimikrobiális (Cisowska et al., 2011) és neurodegeneratív betegségekre (Winter and Bickford, 2019) kifejtett pozitív hatásait, melynek molekuláris hátterét e dolgozat nem tárgyalja részleteiben.

3.2.2. A tiamin

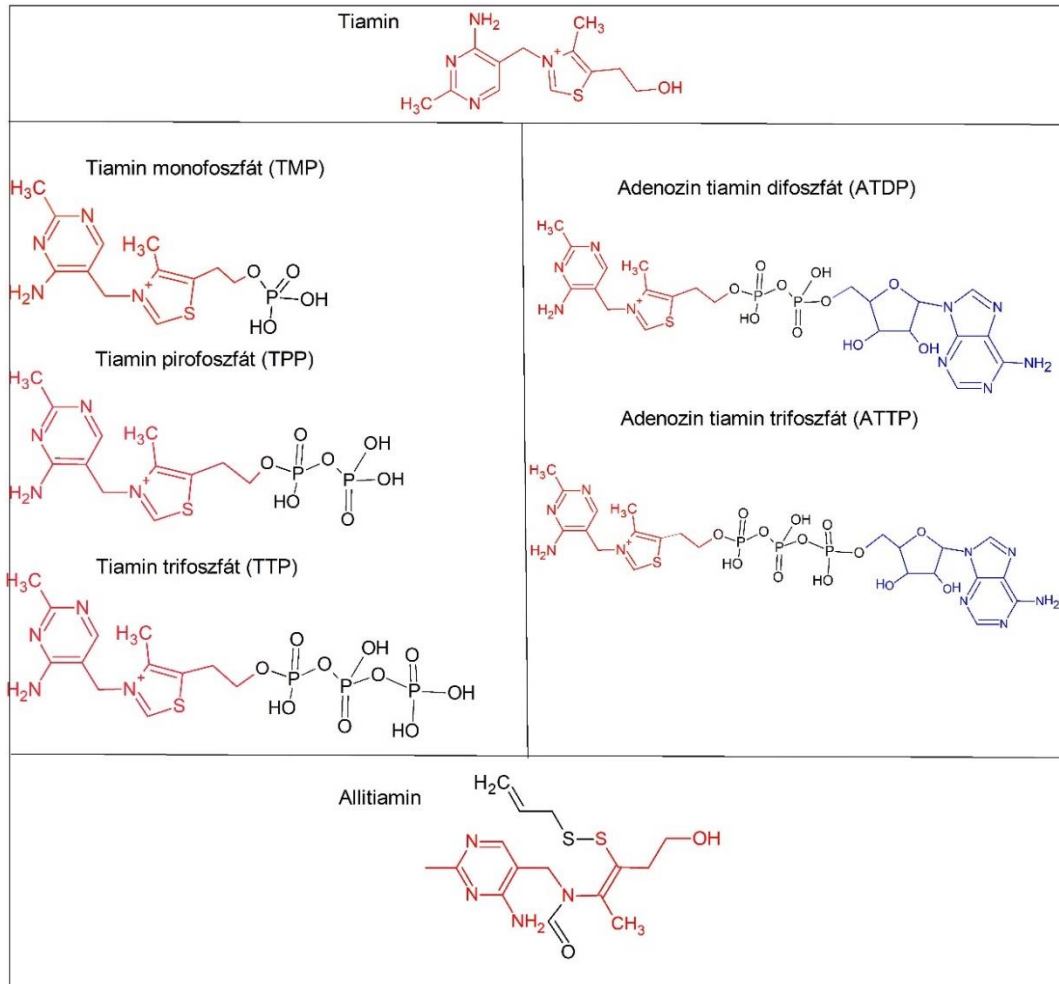
3.2.2.1. A tiamin általános jellemzése

A tiamint (B₁-vitamin) fedezték fel elsőként a vitaminok közül. A 19. század végén *Christiaan Eijkmann* holland orvos a beriberi betegség tanulmányozása során munkatársaival megállapította, hogy az egy – a rizs héjában egyébként jelenlévő – vegyület hiányában fellépő kórkép. 1912-ben *Casimir Funk* olyan rizskorpa eredetű kivonatot készített, ami képes volt enyhíteni a beriberi tüneteit. A primer amin (-NH₂) funkciós csoportot tartalmazó hatóanyagot bázisos jellege és gyógyhatása folytán „vitamine”-nek (vitális amin, élet+amin) nevezte el, innen ered a vitamin szóhasználat. *Barend C. Jansen* és *Willem Donath* holland kémikusok 1926-ban először állítottak elő tiszta B₁-vitamint kristályos formában, amit a beriberi betegség idegrendszeri tüneteit enyhítő/gyógyító hatása után aneurinnak (neuritisz = ideggyulladás) neveztek el. 6 évvel később *Adolf Windaus* Nobel-díjas német vegyész meghatározta az aneurin kémiai összetételét. A vegyületben lévő kénatom és amincsoport alapján az aneurin helyett a tiamin nevet javasolta. *Hans Andersagnak* 1937-ben sikerült a B₁-vitamint szintetikus úton előállítania (Carpenter, 2012). Az ezt követő évtizedekben a kutatók számos tiamin analógot szintetizáltak azok jobb farmakológiai hasznosíthatósága reményében (Volvvert et al., 2008). 1954-ben a *Fujiwara* vezette japán kutatócsoport fokhagymából (*Allium sativum*) egy apoláris tiaminszármazékot izolált, amit – a fokhagyma latin neve alapján – allitiaminnak neveztek el (Fujiwara et al., 1954).

Kísérleteim során az allitiamint vizsgáltam endothel sejtkultúráján. Tekintettel az allitiaminnal kapcsolatos csekély szakirodalomra, valamint a tiaminnal való szoros szerkezeti rokonságára (lásd 5. ábra), az alábbiakban a tiamin növényekben való metabolizmusának és funkciójának, valamint humán élettani hatásainak fontosabb aspektusait, továbbá a humán gyógyászatban használt szintetikus tiamin analógról, a benfotiaminról szerzett releváns ismereteinket tekintem át.

A tiamin (B₁-vitamin) vízben oldódó vitamin. Szerkezetére egy pirimidin és egy tiazol gyűrű jellemző, amelyek egy metilénhíd segítségével kapcsolódnak. A pirimidin gyűrű egy amino- és egy metilcsoporttal, míg a tiazol gyűrű egy metil- és egy hidroxetilcsoporttal szubsztituált (Tylicki et al., 2018). A B₁-vitamin a szervezetben hat különböző alakban fordul elő. Ezek foszforilációs és adenozilációs állapotukban különböznek egymástól (Fitzpatrick and Chapman, 2020). Az 5. ábra mutatja a B₁-vitamin családba tartozó vegyületek, valamint az allitiamin kémiai szerkezetét. A tiamin biológiai szerepét

reakcióiban túlnyomórészt tiamin pirofoszfát alakjában tölti be (Rapala-Kozik, 2011). Mint az összes vitamin, a tiamin is érzékeny az oxidációra, a pH- és hőváltozásra, valamint az UV sugárzásra (Schnellbaecher et al., 2019).



5. ábra A tiamin és származékai, valamint az allitiamin kémiai szerkezete.

Pirossal jelölve a tiamin alapegység. A tiamin-származékok foszforilációs (fekete) és adenozilációs állapotukban (kék) különböznek egymástól

A tiamin tiazol (hidroxietil-tiazol-foszfát: HET-P) és pirimidin (hidroximetil-pirimidin-pirofoszfát: HMP-PP) prekursorai a kloroplasztiszokban szintetizálódnak (6. ábra). A tiamin-monofoszfát (TMP) a HMP-PP és HET-P kondenzációjából keletkezik. A biológiailag aktív forma, a tiamin-pirofoszfát (TPP) szintézise során a TMP először defoszforileződik tiaminná, ami a későbbiekben foszforileződik a tiamin-pirofoszfát-kináz (TPK) katalizálta reakcióban (Fitzpatrick and Chapman, 2020).

be (Kruger and von Schaewen, 2003). A TPP esszenciális a α -ketoglutarát-dehidrogenáz működéséhez is, ami kulcsfontosságú enzim a nitrogén asszimilációban, az aminosav-anyagcserében, a glioxilát-hasznosításban, valamint fontos szerepet játszik a jelátvitelben és energiatermelésben (Bunik and Fernie, 2009). Az elágazó láncú valin, leucin és izoleucin aminosavak szintézisének első lépését katalizáló acetohidroxisav-szintáz aktivitása is TPP-függő (Chang and Duggleby, 1997). A TPP kofaktora a 2-deoxi-xilulóz-5-foszfát-szintáznak is, amely katalizálja a piruvát és a gliceraldehid-3-foszfát kondenzációját 1-deoxi-d-xilulóz-5-foszfáttá, ami az izoprenoidok mevalonát útvonaltól független bioszintéziséhez szükséges prekursor (Eisenreich et al., 1998).

A tiamin, valamint származékai, nem kofaktor funkciókat ellátva, jelátviteli molekulaként fontos szerepet játszanak kórokozók elleni védekező mechanizmusokban, valamint a tiamin metabolizmus a növények abiotikus stressz elleni védekezésének is része (Goyer, 2010).

3.2.2.2. *A tiamin, mint esszenciális mikronutriens*

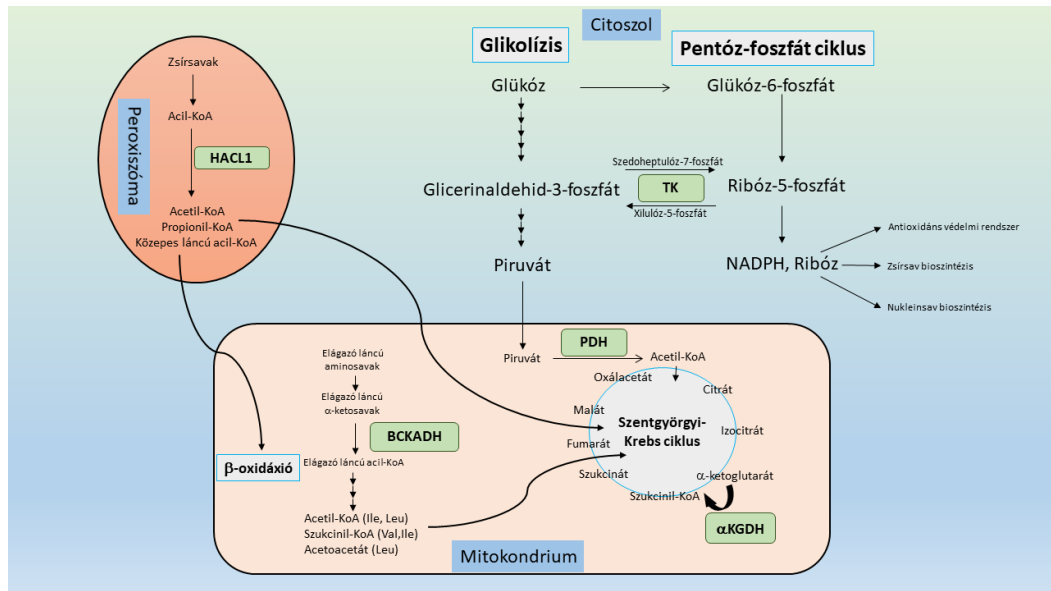
Az előzőekben részletesen bemutatott antocianinokkal ellentétben az allitiamin biológiai aktivitásával kapcsolatban jóval kevesebb szakirodalom áll rendelkezésre. Mindazonáltal, a tiamin és szintetikus analógjainak farmakológiai funkciói intenzív kutatások tárgya. Az alábbiakban a tiamin és szintetikus származékainak élettani jelentőségét kívánom bemutatni.

A tiamin a humán szervezet számára nélkülözhetetlen mikrotápanyag. Az emberi test tiamin ellátása szinte teljes mértékben az étrendi beviteltől függ tekintettel az endogén bioszintézis hiányára, noha a mikrobiota egyes mikroorganizmusai képesek a tiamin szintézisére (Rowland et al., 2018). A tiaminban gazdagabb táplálékforrások: teljes kiőrlésű gabonák, barna rizs, sovány húsok, szójabab, diófélék, szárított bab, borsó, gabonafélék (Osiezagha et al., 2013).

A legtöbb hidrophil mikrotápanyaghoz hasonlóan a tiamin nagy része is a jejunumban szívódik fel. A bél lumenében az alkáli foszfatázok katalizálják a tiamin foszforilezett származékainak szabad tiaminná való hidrolízisét. A szabad tiamin 1 μ M-nél nagyobb koncentrációban passzív diffúzió útján, míg ennél kisebb koncentrációban tiamin transzporter fehérjéken (THTR1/2) keresztül, energiafüggő folyamatban kerül a vékonybél epitheliális sejtjeibe. Itt a tiamin a TPK-1 katalizálta reakcióban TPP-tá alakul, ami defoszforileződik az enterociták bazális membránja számára átjárható TMP-tá.

A TMP ATPáz-függő transzportrendszeren keresztül jut a véráramba. A szabad tiamin THTR2-n keresztül is eljuthat a véráramba az enterociták bazolaterális membránján keresztül (Rindi and Laforenza, 2000). A TMP és a tiamin szabadon kering a plazmában vagy a szérumban, míg a TPP több mint 90%-a az eritrocitákban és a leukocitákban lokalizálódik (Talwar et al., 2000).

A szervezet össztiaminjának mintegy 80%-át a kétszeresen foszforilált forma, a TPP alkotja (Collie et al., 2017). A humán szervezet számára a TPP – mint a fent bemutatott növények esetében is – a tiamin metabolikusan aktív formája, nélkülözhetetlen kofaktor a szénhidrátok és aminosavak metabolizmusában részt vevő több enzimkomplexben (Dhir et al., 2019) (7. ábra).



7. ábra TPP-függő enzimek és metabolikus útvonalai

α -KGDH: α -ketoglutarát-dehidrogenáz, **BCKADH:** Elágazó láncú α -ketoacil-dehidrogenáz, **HAACL1:** 2-hidroxiacil-CoA-liáz, **PDH:** Piruvát-dehidrogenáz, **TK:** Transzketoláz

(Shibani Dhir et al., 2019. alapján saját szerkesztés)

3.2.2.2.1. A tiamin funkcióinak biokémiai alapjai

A glükóz direkt oxidációja a citoszolban lejátszódó pentóz-foszfát ciklusban megy végbe. Az anyagcsereútvonal meghatározó enzimének, a transzketoláznak a működéséhez TPP-ra van szükség. A pentóz-foszfát ciklus közttermékei – egyebek mellett – a NADPH és a ribóz-5-foszfát (R-5-P). A NADPH koenzimként szolgál egyes

bioszintetikus reakciókban (pl. zsírsavszintézis), valamint az enzimatis antioxiidáns védelemben fontos szerepet játszó enzimek számára (Stincone et al., 2015). Az R-5-P a DNS és RNS bioszintézis kiindulási vegyülete, amelynek szintézise fokozott a gyorsan proliferáló sejtekben. Ezek alapján a tiamin hiány fokozott oxidatív stresszt, alacsonyabb sejtproliferációt, valamint csökkent zsírsavszintézist (mielint) eredményezhet, melyek súlyos neuronális következményekkel járhatnak az agy fejlődése során (Dhir et al., 2019). Egereken végzett kísérletben azt találták, hogy a tiaminhiány csökkent neurogenézishez vezet egerek agykérgében és hippocampusában (Zhao et al., 2009).

A peroxiszómák fontos szerepet játszanak a hosszú ($C > 22$), valamint az elágazó szénláncú zsírsavak degradációjában, amelyek metabolizmusa mitokondriális β -oxidáción keresztül nem valósulhat meg. A TPP a peroxiszómában lokalizálódó 2-hidroxiacil-CoA-liáz (HACL1) kofaktora, ami az α -hidroxiacil-CoA származékokat hasítja az 1-es és 2-es szénatom között (α -oxidáció) (Fraccascia et al., 2011). A tejtermékekben és vörös húsokban lévő fitánsav egy 20 szénatomos elágazó láncú zsírsav, amelyet 3-as helyzetben egy metilcsoport szubsztituál, melynek következtében β -oxidációja gátolt (Foulon et al., 1999). A HACL1 enzim katalizálja a 3-metil-elágazó láncú és az egyenes láncú 2-hidroxi zsírsavak hasítását. Tiaminhiány következtében fellépő nem megfelelő fitánsav metabolizmus okozta triglicerid felhalmozódás súlyos károsodásokhoz vezethet, melynek megnyilvánulási formái a kisgyermeki ataxia, a perifériás polineuropátia, látás-, hallás- és szaglászavarok, egyes esetekben szív működési zavar (Wierzbicki et al., 2002).

A mitokondriumban a TPP három enzim kofaktora. A PDH a glükóz katabolizmusa során keletkező piruvát oxidatív dekarboxilezését végzi a mitokondriumban. A reakció eredményeként keletkező acetyl-CoA a Szentgyörgyi-Krebs ciklusba lépve alakul tovább, amivel az enzimatis reakció lényegében kapcsolatot teremt a glikolízis és a citromsavciklus között (Naito et al., 1998). Tiaminhiány okozta csökkent PDH aktivitás a tejsav intracelluláris növekedéséhez és a sejtek ATP termelésének sérüléséhez vezet, ami súlyos esetben tejsavas acidózist eredményezhet újszülöttekben (Soares-Fernandes et al., 2008).

Az α -ketoglutarát dehidrogenáz (α KGDH) – szintén a mitokondriumban – az α -ketoglutarát szukcinil-CoA-vá való átalakulását katalizálja. Alacsony tiamin szint esetén jelentősen csökken az α KGDH aktivitás, ami csökkent energiatermelést és glutamát felhalmozódását eredményezi (Gibson et al., 2005). Az α KGDH csökkent aktivitásából

fakadó sérült oxidatív anyagcserét szintén összefüggésbe hozták neurodegeneratív betegségekkel (Shi et al., 2007).

A mitokondrium harmadik TPP függő enzime az elágazó láncú α -ketoacil-dehidrogenáz, ami az elágazó láncú aminosavakat (leucin, izoleucin és valin) alakítja át acil-CoA-vá (Ananieva and Conway, 2020). Ezek az aminosavak szükségesek a fehérjeszintézishez, egyes katabolikus termékeik felhasználhatók a citromsavcikluson keresztül energiatermelésre, valamint – a leucin kivételével – a glükoneogenezis prekursoraiként (Sperringer et al., 2017). Egy patkányokon végzett kísérlet összefüggésbe hozta a tiaminhiány esetén megfigyelt mediális thalamus neuronális sejtjeinek defektusát a BCKDH enzim csökkent aktivitásával (Navarro et al., 2008).

Összességében a tiaminnak – pontosabban a kétszeresen foszforilált formájának – enzimek kofaktoraként fontos szerepe van alapvető metabolikus mechanizmusok megfelelő működésében.

A fentiek túl egyre több bizonyíték mutat rá a tiamin nem koenzim szerepére (Aleshin et al., 2019). McLure és munkatársai leírták, hogy a TPP képes szabályozni a p53 transzkripciós aktivitását, azáltal, hogy kötődik a fehérjéhez és megakadályozza annak DNS-sel történő interakcióját (McLure et al., 2004). Tekintettel arra, hogy a p53 – egy sor más celluláris folyamat befolyásolásán túl – aktiválja a THTR1 expresszióját (Lo et al., 2001), felmerült annak a lehetősége, hogy a p53 a TPP szintjének szenzoraként funkcionálhat.

Már a 90-es években leírták a tiaminszármazékok neurotranszmissziót facilitáló hatását, mai ismereteink szerint acetilkolin (Bettendorff and Wins, 2013), dopamin (Yamashita et al., 1993), noradrenalin (Dyatlov, 1994) felszabadulását fokozza a szinapszisokban.

Az ösztiaminkészlet nagy hányadát a TPP teszi ki, azonban egyes állati szövetekben (sertés és csirke vázizomzata) a TTP meghaladja a TPP koncentrációját (Egi and Kawasaki, 2003). Leírták, hogy a TTP a rapsyn fehérje foszforilezésében – legalább részben – szerepet játszik. A rapsyn fehérje rögzíti a citoszkeletonhoz az acetilkolin-receptorokat és egyéb strukturális fehérjéket (Nghiem et al., 2000).

Az adozin tiamin trifoszfátról, a TTP adenilezett származékáról leírták, hogy csökkenti a poli-(ADPribose)-polimeráz-1 (PARP1) enzim az aktivitását, ami a sérült DNS hibáit javító mechanizmus iniciálója (Tanaka et al., 2011).

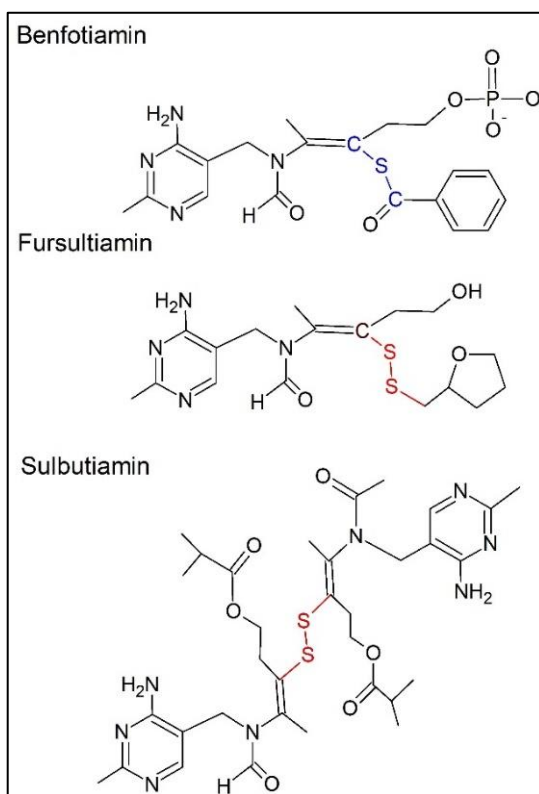
Növényi szövetekben több fehérjéről igazolták, hogy specifikusan kötik a vitamin foszforilálatlan formáját. Emlősök esetén leírtak néhány tiamin kötő fehérjét, de pontos

szerepük továbbra sem tisztázott. Parkhomenko és munkatársai *in vivo* tanulmányukban patkányok agyából izoláltak tiaminkötő fehérjét, amelyről azt is bizonyították, hogy a tiamin-kötő aktivitás főként a szinaptikus vezikulákhoz és a szinaptoszómális membránokhoz kapcsolódik (Parkhomenko et al., 2001).

Kevés és még pontatlan ismeretünk van a tiamin nem koenzim funkcióit illetően, ugyanakkor számos szerző hívja fel a figyelmet arra, hogy a jövőben kulcsfontosságú kérdéssé válhat ezen nem koenzim szerep alaposabb megismerése, különös tekintettel a neurodegeneratív betegségek terápiájában való farmakológiai alkalmazás terén (Aleshin et al., 2019; Bettendorff and Wins, 2013; Mkrtychyan et al., 2015).

3.2.2.3. A tiamin szintetikus analógja a benfotiamin

A tiaminhiány kezelésével kapcsolatos egyik farmakológiai stratégia a tiamin szintetikus analógjainak alkalmazása. A tiamin analójként tiamin-diszulfid (fursultiamin, szulbutiamin) és S-acil származékokat (benfotiamin) szintetizáltak (Volvert et al., 2008). Ezeknek a vegyületeknek a lipofil jellege biztosítja a membránon való könnyebb átjutásukat. A szintetikus tiamin származékok közül a gyógyászatban jelenleg alkalmazott forma a benfotiamin.



8. ábra A tiamin szintetikus analógjainak szerkezete.

A benfotiamin képes enyhíteni az alábbiakban (3.4.3.1. fejezet) részletesen ismertett poli-ol-, hexózamin-, PKC- (protein kináz C), AGEs (advanced glycation end-products: késői glikációs végtermékek) útvonalak fluxusát azáltal, hogy a glükóz katabolizmus egy másik opcionális útvonalára, a pentóz-foszfát ciklus irányába tolja a glükózt. Ennek háttérében a transzketoláz enzim benfotiamin hatására bekövetkező fokozott aktivációja áll (Brownlee, 2005). Ez a felismerés a 2000-es évek elején számos, a benfotiaminnal kapcsolatos kutatást indított újtárra, amelyek bizonyították, hogy a benfotiamin csökkenti a krónikus hiperglikémia okozta mikrovaszkuláris szövődmények, a retinopátia (Obrenovich and Monnier, 2003), a nefropátia (Balakumar et al., 2009), a neuropátia (Cameron et al., 2005) progresszióját.

A benfotiamin farmakológiai aktivitását illetően a transzketoláz aktivitás fokozásától független mechanizmusokat is leírtak. Különböző vese sejtvonallal végzett *in vitro* kísérletben igazolták, hogy a benfotiamin képes direkt antioxidáns hatást kifejteni. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy antioxidáns kapacitása hozzájárulhat a diabeteses szövődmények javulásához (Schmid et al., 2008). Egy *in vivo* kísérletben leírták, hogy a ciszplatin (egy platina tartalmú rákellenes szer) által kiváltott DNS károsodások ellen a benfotiamin hatékonynak bizonyult patkányok esetén. Egyúttal az eredmények mögött a benfotiamin antioxidáns kapacitását sejtetik a szerzők (Harisa, 2013). Egy másik patkányokkal végzett kísérletben megállapították, hogy a benfotiamin enyhíti az oxidatív stresszt, ami által befolyásolja az NF- κ B-hez kapcsolódó szignál transzdukciós folyamatokat uveitis modellben (Yadav et al., 2009).

S. Gadau és munkatársai vizsgálataik során arra az eredményre jutottak, hogy a benfotiamin segíti a diabeteses állatok poszt-ischaemiás gyógyulását az angiogenezis PKB/Akt által közvetített potenciózásával és az apoptózis gátlásával (Gadau et al., 2006).

3.3. Az endothel sejt és funkciói

Sokáig úgy tartották, hogy az endothelium csak a víz és az elektrolitok átérésztésére szolgál. Széleskörű fiziológiai kutatások napjainkra az endothelium működésének alaposabb megértéséhez vezettek, világossá vált, hogy egy komplex, számos élettani folyamatban résztvevő sejtípus.

Az erek belső falát egyrétegben borítva, az endothel sejtök szelektív barriert képeznek a vér és más szövetek között, egyúttal – a teljesség igénye nélkül – fontos szervező

(gyulladás, alvadás lokális indítása, behatárolása), termelő (VIIIfaktor, von Willebrand faktor), lokális véráramlást szabályozó funkciót lát el (Pries and Kuebler, 2006). **Permeabilitásuk** attól függ, milyen mértékben fenesztrált az endothelium. Egyes szervek – például bőr vagy a szív ereinek – endothelioma folyamatos, csak víz és kisebb, főleg apoláros molekulák képesek átjutni a sejtek között, a nagyobb molekulák specifikus transzmembrán csatornákon, vagy transzcitózissal juthatnak át. A fenesztrált endothelium – például a belső elválasztású mirigyekben – nagyobb átteresztőképességgel rendelkezik (50-60nm átmérőig), a nagyobb molekulák számára permeabilitása hasonló a nem fenesztrált endotheliumhoz (Sukriti et al., 2014).

Az endothelium pro- és antikoaguláns faktorok termelésével fontos szerepet játszik a **hemosztázis** folyamatában. A prokoaguláns faktorok a véralvadási fehérjekaszád bizonyos lépéseit erősítik, valamint fokozzák a trombocita adhéziót, aggregációt. Az antikoaguláns mediátorok az aktiválódó véralvadás sejtes és humorális részének deregulációját idézik elő (Verhamme and Hoylaerts, 2006).

Az endothelium fontos szerepet játszik a **vaszkuláris tónus**, ezzel a lokális véráramlás szabályozásában. Az endothel sejtek parakrin, endokrin szignálok, hőmérséklet, nyíró erők egyéb körülmények eredőjét értágító és érszűkítő anyagok szintézisével közvetítik. Az endothel sejtek által termelt vazodilatátorok, mint például a nitrogén-monoxid (NO), valamint a különböző vazokonstriktorok – például endothelinek – megfelelő egyensúlya szabályozza az ereket körülvevő simaizomsejtek tónusát, és ezzel a helyi véráramlást a helyi igényekhez alakító érrendszeri rezisztenciát (Sandoo et al., 2010).

Az endothelium az **érszerveződés** folyamatában is meghatározó szereppel bír. Egyes angiogenezist serkentő faktorok – a fibroblaszt növekedési faktor és a vaszkuláris endothel növekedési faktor (VEGF) – hatására a migrációs és proliferációs képességük megnő, végeredményben a károsodott keringésű területek vérellátása javulhat (Lamallice et al., 2007).

Az endothel sejtek a szervezet egyik meghatározó védekező mechanizmusát, a **gyulladást** is támogatják azáltal, hogy elősegítik a leukociták extravazációját. Gyulladásos faktorok hatására olyan adhéziós molekulákat termelnek, melyek lehetővé teszik a fehérvérsejtek fertőzés helyére történő migrációját. Ezen túl az endothel sejtek is képesek proinflammatorikus citokinek termelésére, amivel a gyulladásos folyamatok elmélyítéséhez járulnak hozzá (Trepels et al., 2006) (részletesen ld. 3.4.2. fejezet).

3.4. A vizsgált kórélettani folyamatok és az endothelium

3.4.1. A gyulladás és az endothelium

A gyulladás a szervezet szöveti sérülésre vagy fertőzésre adott, láncreakciókon alapuló válasza. A bonyolult, hálózatos reakció célja a fertőző ágens eliminálása, illetve a szöveti károsodás helyreállítása. Ebben a folyamatban elsősorban az immunrendszer sejtjei, szövetei és szervei játszanak szerepet, de más szövetek és szervek sejtjes és humorális elemei is közreműködnek. Az endothelium különböző szubcelluláris és molekuláris mechanizmusok – elsősorban az endothel-fehérvérsejt kölcsönhatások – révén meghatározó szerepet játszik e folyamatok szabályozásában (Punchard et al., 2004).

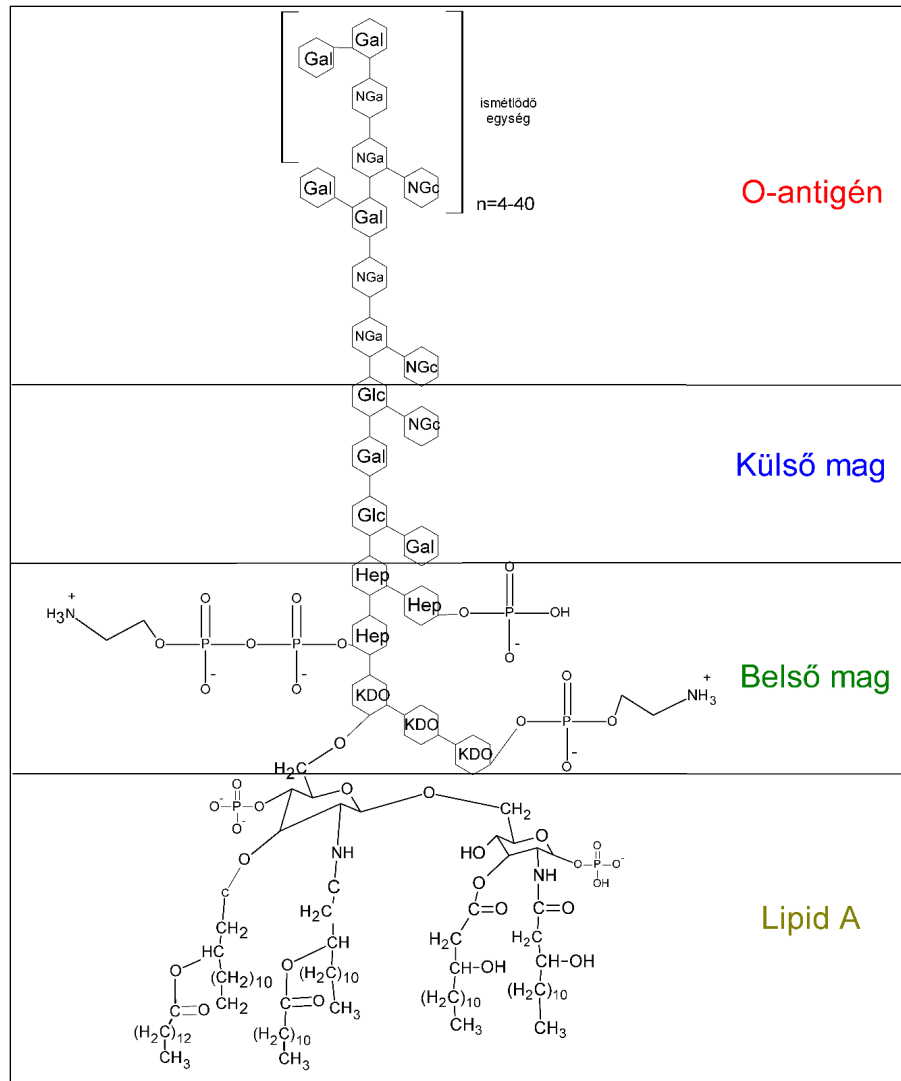
Gyulladás során a vérben keringő fehérvérsejtek az endotheliumon keresztül jutnak a sérült szövetekbe. A fehérvérsejtek kivándorlása az erekből az extravasatio folyamata, amit az endothel sejtek aktiválódása iniciál. Adhéziós molekulák (P-szelektinek, E-szelektin, ICAM-1) plazmamembránra való transzlokálódását követően a fehérvérsejtek áramlása lelassul, majd a sérült területen összetett mechanizmus (diapedezis) révén kilépnek az érpályából. Ezzel az endothel sejtek a fehérvérsejtek pontos célba jutásának hatékony résztvevői (Filippi, 2016).

Az endothelium gyulladást aktivációját számos exogén és endogén tényező kiválthatja a szervezetben. Jól ismert kiváltó ágens a bakteriális eredetű lipopoliszacharid (LPS). Kutatásom egyik részében a meggy antocianin-extraktumának hatását vizsgáltam endothel sejtek LPS által indukált gyulladást okozó folyamataiban. A következő fejezetben az LPS molekulát és a hozzá kapcsolódó szignál transzdukciós folyamatokat, azaz az LPS által az endothel sejtekben kiváltott gyulladást okozó válaszképet ismertetem.

3.4.1.1. *LPS: jelátvitel és citokin burst az endothel sejtekben*

Az LPS a Gram-negatív baktériumok sejtfalának alkotóeleme. Gram-negatív baktériumok által okozott súlyos infekciók patogenezisében fontos szerepet játszik. Szerkezetét tekintve 3 fő részből áll (9. ábra). A prokarióta sejt sejtfalától kifelé haladva legelső eleme a lipid A, amely egy speciális fosfolipid. Aktívan nem szekretálódik, a bakteriális sejtek pusztulásakor szabadul fel (ezért hívják endotoxinnak). Kémiai természetéből adódóan hőstabil és rezisztens a proteolitikus enzimekkel szemben. Az LPS következő egysége a külső és belső magból álló R mag. A belső mag ritkán, míg a külső mag gyakrabban előforduló cukormolekulákat tartalmaz. A külső maghoz

kapcsolódik az O-specifikus oldallánc, ami 3-5 cukormolekulából álló egységek polimerje. Nagy kémiai és antigenitásbeli variabilitást mutat, ezáltal a legtöbb Gram-negatív baktérium szerológiai csoportosításának alapját képezi (Bertani and Ruiz, 2018).

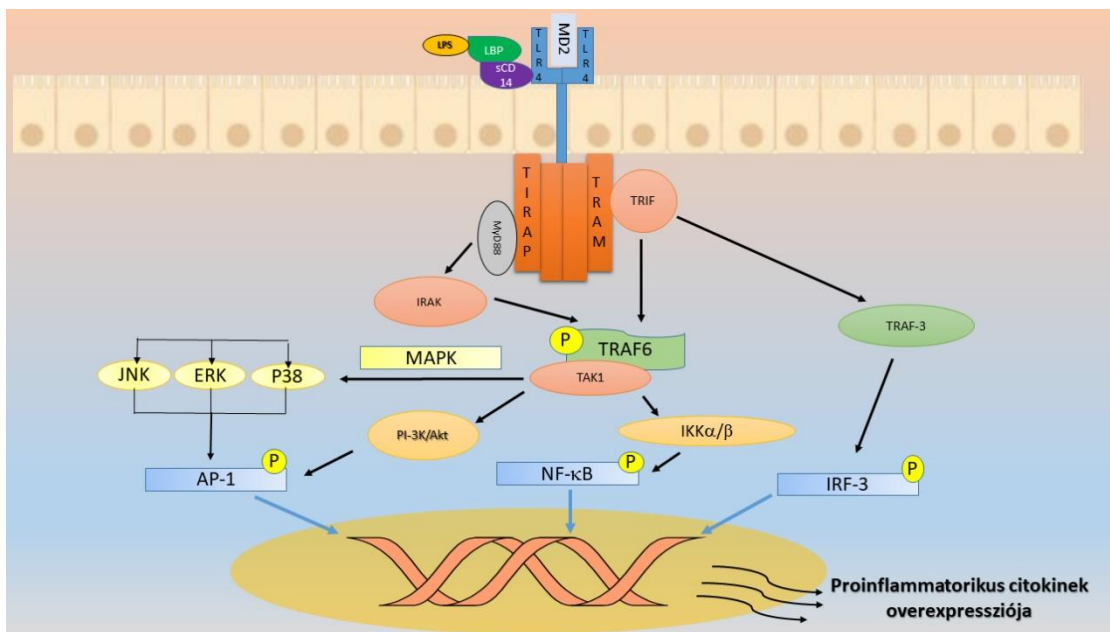


9. ábra A lipopoliszacharid szerkezete

Glc: glükóz, **KDO:** 3-dezoxi- α -D- manno-oktulozonsav, **Hep:** Heptulóz, **NGa:** galaktozamin, **NGc:** glükózamin (<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/lipopolysaccharides.html#ref> alapján saját szerkesztés)

Az LPS lipid A része felelős a toll like receptor 4 (TLR4) aktivációjért. Az LPS a vérben az LPS-kötő fehérjéhez kapcsolódik, ami a CD14 (cluster of differentiation) molekulához kötődik. A CD14 membránhoz kötött (mCD14), vagy a plazmában, szolubilis formában (sCD14) van jelen a humán szervezetben. Az endothel sejtek a

membránhoz kötött mCD14-et nem expresszálják, ezért szükségük van a sCD14-re az LPS-aktivációban. A képződött komplex kapcsolatba lép a TLR4 dimer és MD-2 (Myeloid differentiation factor 2) molekulákkal, ami egy sor szignáltranszdukciós folyamat beindítását eredményezi a humán sejtekben. Első lépésében a TLR4 citoplazmatikus doménjéhez különböző adaptor molekulák kötődnek. Az LPS által kiváltott CD14-MD2-TLR4 szignalizáció az intracelluláris térben két útvonalon halad tovább (10. ábra) (Kawasaki and Kawai, 2014).



10. ábra Az LPS által kiváltott TLR4-szignalizáció.

AP-1: Aktivátor protein-1, **ERK:** Extracelluláris szignál által szabályozott kináz, **IRAK:** IL-1 receptor asszociált kináz, **IKK α / β :** inhibitor κ -B-kináz α / β , **IRF-3:** Interferon szabályozó factor 3, **JNK:** C-Jun N-terminális kináz, **LBP:** Lipopoliszacharid kötő fehérje, **LPS:** Lipopoliszacharid, **MAPK:** Mitogén-aktivált protein-kináz, **MD2:** Myeloid differenciációs factor-2, **Myd88:** Mieloid differenciációs faktor 88, **NF- κ B:** Nukleáris faktor-kappa B, **P38:** p38 mitogén-aktivált protein-kináz, **PI-3K/Akt:** Fosfatidil-inozitol-3 kináz/protein kináz B, **sCD14:** Szolubilis CD14, **TAK1:** transzformáló növekedési faktor β aktiváló kináz 1, **TIRAP:** MyD88 adaptor-szerű fehérje, **TLR4:** Toll like receptor 4, **TRAF-6:** TNF receptor asszociált factor-6, **TRAM:** TRIF-kapcsolt adaptor molekula, **TRIF:** Interferon- β -t indukáló adaptor fehérje,

(<https://www.abcam.com/content/toll-like-receptors-very-clever-molecules-1> alapján saját szerkesztés)

3.4.1.2. *Arachidonsav-származékok szerepe a lokális gyulladós reakciókban*

Szöveti károsodást okozó fizikai, kémiai vagy biológiai (fertőzés) tényezők esetén, eleinte csak a behatás helyén, gyulladós reakció indul. Az endothel sejtek, trombociták, immunsejtek termelik a helyi gyulladós mediátorokat, amelyek többszöri pozitív visszacsatolás révén erősítik egymás aktivációját és hozzájárulnak a gyulladás elmélyüléséhez. A bonyolult, egymással szoros összefüggésben lévő folyamatok egyike a sejtmembránok foszfolipidjeit alkotó arachidonsav (AA) metabolizmusa, amely során különböző lipidmediátorok keletkeznek (Chatterjee et al., 2017). Kutatásaim során a molekulák koncentrációjának és az őket szintetizáló enzimek mRNS szinten történő expressziójának a változását vizsgáltam, ezért az alábbiakban az AA metabolizmust magát, illetve a vég- és közttermékek biológiai funkcióját ismertetem.

A sejtmembránok felépítésében részt vevő foszfolipid komponensekből – foszfatidil-etanolamin, foszfatidil-kolin és foszfatidil-inozitol – megfelelő szignálra (pl. stressz hatás) a PLA2 enzimatis katalízise mellett keletkezik az AA (Murakami et al., 2000). Az AA négy különböző enzimatis úton és egy nem enzimatis módon metabolizálódhat (Sonnweber et al., 2018), a reakciókban keletkezett származékokat eikozanoidoknak is nevezik az AA húsz szénatomos alapváza után.

A ciklooxygenáz út első lépésében a COX-1 és COX-2 – másnéven prosztaglandin G/H szintáz metabolizálja az AA-t. A COX-1 és COX-2 kettős katalitikus aktivitással rendelkeznek. Először az AA-t prosztaglandin G₂ (PGG₂)-vé alakítják, majd a következő lépésben peroxidáz aktivitásuk nyomán a PGG₂-ből prosztaglandin H₂ (PGH₂) keletkezik. A PGH₂-ből aztán a tromboxán-szintetáz katalízise mellett tromboxán A₂ (TXA₂), a prosztaciklin-szintetáz által katalizált reakcióban prosztaciklin (PGI₂) valamint további biotranszformációk során egyéb prosztaglandinok (PGD₂, PGF_{2α}, PGE₂) keletkezhetnek (Brock et al., 1999).

Fontos megjegyezni, hogy az eikozanoidok bioszintézisében részt vevő enzimek kifejeződése sejt és szövet függő, például a vérlemezkék döntően TXA₂-t, míg az endothel sejtek jellemzően PGI₂-t termelnek. A COX-1 konstitutív módon expresszálódik és megtalálható a legtöbb emberi szövetben, amely hajlamos az LPS által kiváltott gyulladásra. Az arachidonsav útvonalon a COX-1 kedvezményezett, fő metabolitjai a TXA₂ és a PGD₂ (Rouzer and Marnett, 2009). A TXA₂ növeli a monociták általi proinflammatorikus citokinek termelését, fokozza az endothel sejtek adhéziós molekuláinak expresszióját támogatva a diapedezist, elősegíti a vérlemezkék aggregációját protrombotikus hatást gyakorolva (Smyth, 2010). A TXA₂ potens

vazokonstriktor, fokozott szintézise jelentősen szűkíti a rezisztencia- és koszorúereket, szerepét bizonyították a miokardiális infarktus progressziójában (Walinsky et al., 1984). A PGD₂ elsősorban hízósejtekből felszabaduló mediátor, amely antikoagulánsként gátolja a vérlemezkék aggregációját. Ellentétben a TxA₂-nal, vazodilatációs hatást fejt ki. A PGD₂ által kiváltott értágulat és a fokozott permeabilitás fontos szerepet játszhatnak a gyulladásos folyamatok mellett allergiás reakciókban is (Arima and Fukuda, 2011).

A COX-2 expressziója normál fiziológiás körülmények között elhanyagolható, ugyanakkor baktérium endotoxinok, növekedési faktorok, hormonok és számos citokin képes indukálni (Lipsky et al., 2000). Makrofágokban, endothel sejtekben kifejeződik, expressziója vese- és az agyszövetekben jelentős. Főbb metabolitjai a PGE₂, a PGI₂, a PGD₂ és a PGF₂α (Wang et al., 2019). Ezek közül kísérleteink során a PGI₂ expresszióját vizsgáltuk tenyészteteinkben. A PGI₂-t immunsejtek, fibroblasztok, simaizom sejtek és endothel sejtek termelik. A szintje magasabb a pulmonáris artériás szegmensekben a szisztémás keringéshez képest. A szív és érrendszer egészséges működésében fontos szerepet játszik. PGI₂ analógokat sikeresen alkalmazták pulmonalis artériás hipertónia, DM vaszkuláris szövődményeinek és reperfüziós sérülések kezelésére. Specifikusan gátolja a vérlemezke aggregációt, erőteljes értágító hatással rendelkezik, a monocita-endothel adhézió gátlás révén pedig immunmoduláló aktivitását is leírták (Dorris and Peebles, 2012). A felsorolt PG-ok részt vesznek az immunválasz közvetítésében, az ér tónusának szabályozásában, és a trombusképződés folyamatában is (Ricciotti and FitzGerald, 2011).

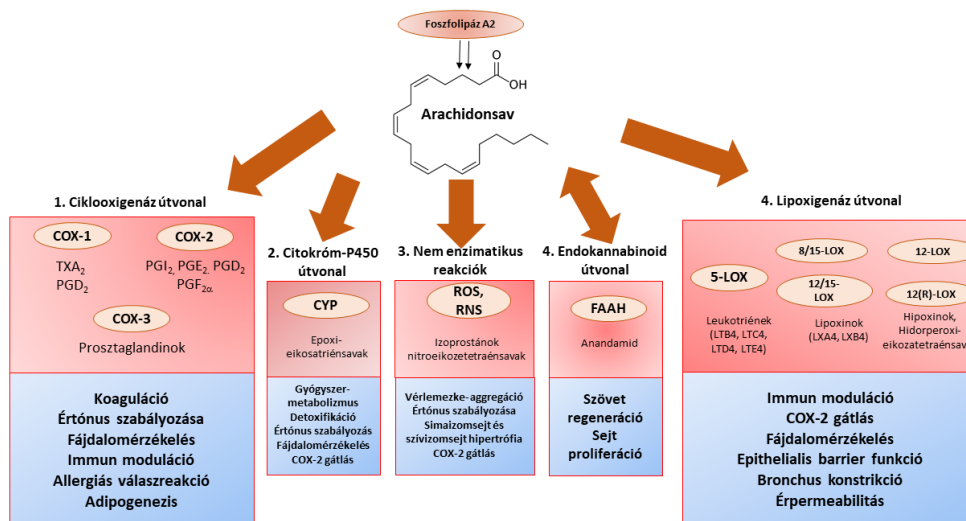
A lipoxigenáz útvonalon az AA-t LOX enzimek – 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX és 15-LOX – metabolizálják. Az 5-LOX 5-hidroperoxi-eikoza-tetraénsavvá (5-HPETE), 5-hidroxi-eikozatetraénsavat (5-HETE) és 5-oxo-eikozetetraénsavat (5-oxo-ETE), valamint különféle leukotriéneket (LT) termel. Ezek a metabolitok fokozzák a neutrofilek toborzását, szabályozzák a diapedezist, az erek permeabilitását, az epitheliális gát működését, fontos szerepet játszanak a légúti megbetegedések patomechanizmusában a hörgőszűkület befolyásolásával. A 8-LOX és 15-LOX átalakítják az AA-t 8- és 15-hidroperoxi-eikoza-tetraénsavvá (HPETE), és elősegítik 15-HPETE származékok termelését (lipoxinok és eoxinok). A 12-LOX az AA-t 12-hidroperoxi-eikoza-tetraénsavvá (12-HPETE) metabolizálja, amely a 12-HETE és a hepoxilinek prekursora. A 8-, 15- és 12-LOX-útvonalak AA-származékai részt vesznek a hiperalgéria kialakulásában, fokozzák a zsírsav-transzlokáz expresszióját, a lipoxinok elsősorban gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal rendelkeznek (Joshi and Praticò, 2015).

A PLA2 katalízise nyomán felszabadult szabad AA a CYP útvonalon is metabolizálódhat. A CYP enzim családnak fontos szerepe van a detoxifikációban és a gyógyszer metabolizmusban. Az AA ilyen irányú biotranszformációja során HETE-k és epoxi-eikoza-triénsavak keletkeznek, amelyek gátolják a COX-2 aktivitást, vazóaktív hatással rendelkeznek, valamint enyhítik a súlyos fájdalomérzetet (Ng et al., 2007).

Az AA a zsírsavamid-hidroláz által katalizált reverzibilis reakcióban anandamiddá alakulhat az endokannabinoid útvonalon keresztül. Az anandamid támogatja a szövetek regenerálódását és a sejtek proliferációját az 1. típusú kannabinoid receptorokkal való kölcsönhatás révén (Izzo and Deutsch, 2011).

Az AA nem enzimatis úton történő metabolizmusa a benne lévő telítetlen C-C kötések oxidációra való nagyfokú hajlamának tulajdonítható. Az AA oxidatív stressz során keletkező szabad gyökök általi oxidációjának eredményei az izoprosztánok és nitro-eikoza-tetraénsavak (Fam and Morrow, 2003).

Összefoglalva, az AA metabolizmusából származó lipidmediátorok számos élettani és kórélettani folyamatban játszanak fontos szerepet. Részt vesznek bizonyos légúti megbetegedések patomechanizmusában, a gyulladásos sejtek toborzásában, a vaszkuláris tónus szabályozásában, fontos szerepet játszanak az oxidatív stressz kialakulásában és befolyásolják a helyi gyulladásos érreakciókat. Az AA metabolizmus legfontosabb enzimeit, metabolitjait, valamint főbb biológiai funkcióit az 11. ábra szemlélteti.



11. ábra Az arachidonsav metabolizmus főbb enzimeit, valamint metabolitjait és azok főbb biológiai funkcióit.

COX: Ciklooxigenáz, **CYP:** Citokróm-P450, **FAAH:** Zsír-savamid-hidroláz, **PGD₂:** Prostaglandin D₂, **PGE₂:** Prostaglandin E₂, **PGF_{2α}:** Prostaglandin F₂ alfa, **PGI₂:** Prostaglandin, **LOX:** Lipoxigenáz, **ROS, RNS:** Reaktív oxigén származékok, Reaktív nitrogén származékok **TXA₂:** Tromboxán, (Sonnweber et al., 2018 alapján saját szerkesztés)

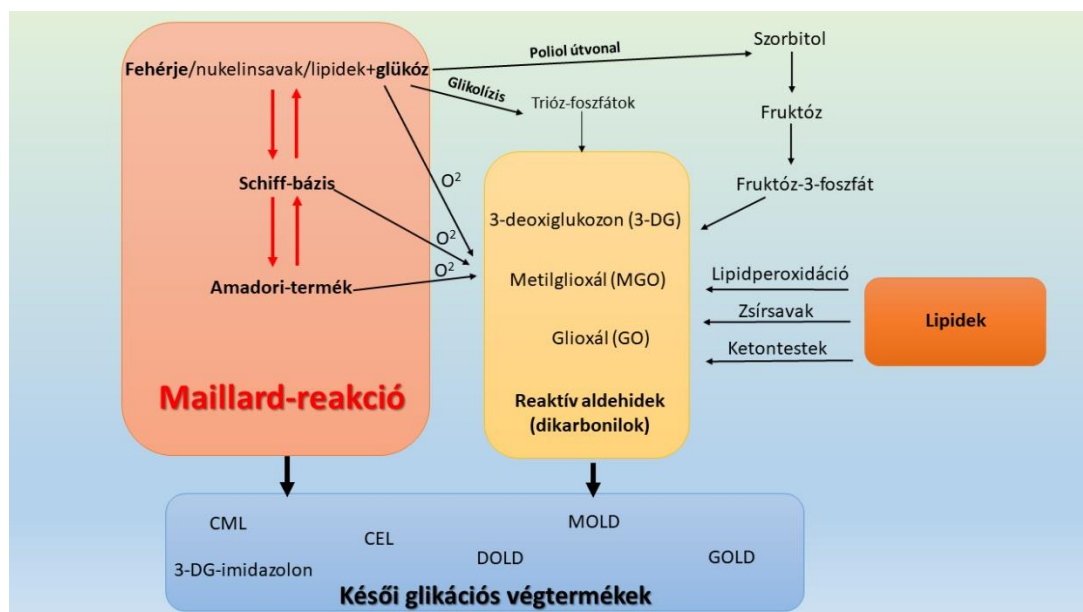
3.4.2. A hiperglikémia és az endothelium

Az inzulintól független glükóztranszporterekkel (GLUT-1,-2,-3) rendelkező sejtekben – az idegsejtek, vörösvérsejtek, β-sejtek, endothel sejtek, a vese glomerulusai – az intracelluláris glükóz koncentráció a hiperglikémiával párhuzamosan emelkedik (Navale and Paranjape, 2016). A DM-ban fennálló hiperglikémiás állapotban több egymással összefüggő patofiziológiai folyamat indul be. Az excesszív glükóz alternatív metabolikus útvonalakra terelődik. Négy fő útvonal fluxusa nő, melyek a következők: poliolszintézis, hexózamin-szintézis, PKC-aktiválódás, AGEs-képződés (13. ábra). Ezek mentén számos káros intermedier képződik, amik a cukorbetegség patogenezisében, szövődményeinek progressziójában kardinális szerepet játszanak (Brownlee, 2001).

A **poliol út** kulcsenzime az aldóz-reduktáz. Glükóz iránt tanúsított alacsony affinitása (magas K_m érték) következtében normál esetben a glükóz aldóz-reduktázon keresztüli metabolizmusa nagyon alacsony mértékben valósul meg. A megnövekedett glükóz koncentráció eredményeként azonban a glükóz szorbitollá történő enzimátikus átalakítása fokozódik. A reakció NADPH-t igénylő folyamat. A magas intracelluláris glükóz a

NADPH fokozott felhasználódásához vezet, ezért annak sejten belüli szintje csökken. Mivel a glutation redukciójához a NADPH nélkülözhetetlen, a folyamat az antioxidáns kapacitás csökkenéséhez vezet (Yan, 2018).

Az **AGEs kialakása** során a redukáló monoszacharidok nem enzimatis úton kovalensen kapcsolódnak aminosavak, fehérjék, lipidek és nukleinsavak szabad aminocsoportjához. Ennek eredményeként Schiff-bázisok keletkeznek, amelyek először instabil Amadori termékek, majd további reakciókon (kondenzáció, fragmentáció, oxidáció) keresztül stabil glikációs végtermékek alakulnak át. Az AGEs-képződés fent részletezett klasszikus útja Maillard reakció néven is ismert. Glikációs végtermékek képződése megvalósulhat a Maillard reakció mellett más reakcióutakon is, amelyek találkozási pontját a reaktív dikarbonilok jelentik (12. ábra). Ezen vegyületcsoport legjelentősebb képviselői a metilglioxál, a glioxál és a 2-deoxiglukozon. Hozzájárulnak az oxidatív stresszhez, akkumulációjukat karbonil stressznek is szokás nevezni. Mind a klasszikus úton, mind a dikarbonil anyagcsereterméken keresztül megvalósuló nem-enzimatis glikáció részt vesz az AGEs-termékek kialakulásában.



12. ábra Az előrehaladott glikációs végtermékek képződésének vázlatja.

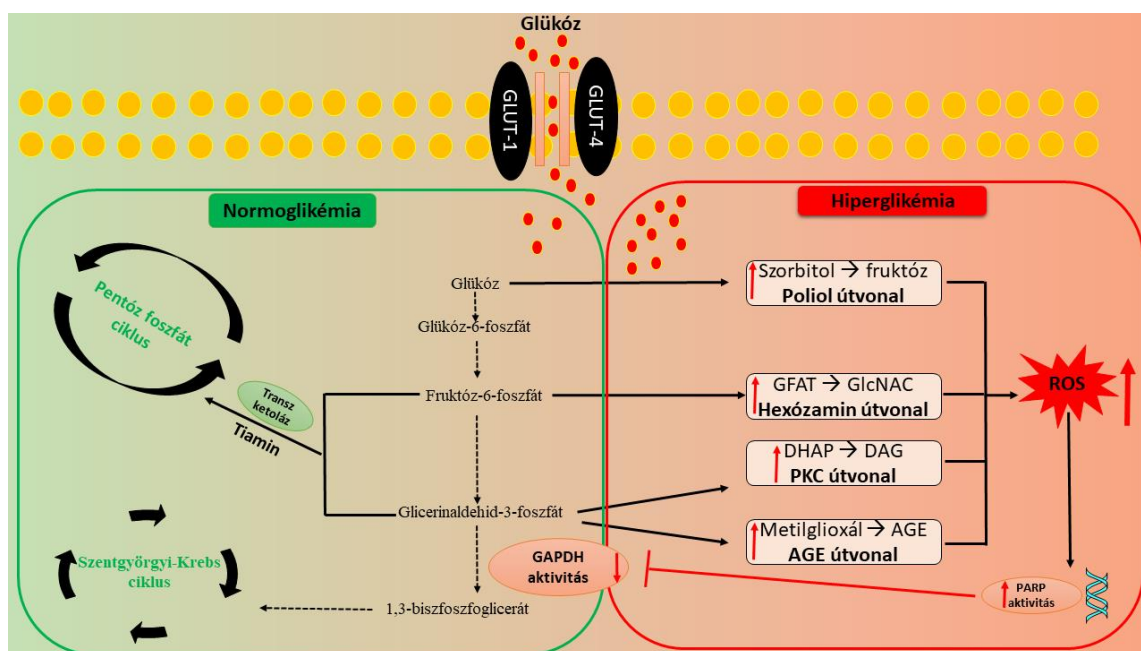
CML: N^ε-karboximetil-lizin, **CEL:** N^ε-karboxietil-lizin, **DOLD:** 3-deoxiglukozon-lizin-dimer, **GOLD:** Glioxál-lizin-dimer, **MOLD:** Metilglioxál-lizin-dimer, (Ott et al., 2014. alapján saját szerkesztés)

Az AGEs szerepe a hiperglikémia patogenezisében alapvetően három szinten nyilvánul meg. Az intracelluláris fehérjék módosítása nyomán megváltozhatnak a fehérjék funkciói. Az AGEs prekursorok kilépve a sejtől olyan extracelluláris mátrix fehérjéket modifikálhatnak, amelyek később – autokrin módon – befolyásolhatják a mátrix-sejt közötti interakciót. A sejtől kilépő AGEs prekursorok plazmafehérjéket is módosíthatnak, amelyek AGEs-t felismerő receptorokhoz kötődve gyulladási folyamatokat indíthatnak el (Perrone et al., 2020).

Az intracelluláris glükóz koncentráció emelkedése növeli a dihidroxiaceton-foszfát szintjét, ami fokozza a diacil-glicerol (DAG) *de novo* szintézisét. A megemelkedett DAG koncentráció a **PKC** bizonyos izomformáinak (α , β , γ , δ , ϵ ,) **aktiválásához** vezet. A PKC enzimsalád ezen izomformái felelősek olyan gének expressziójáért – az endotheliális nitrogén-monoxid szintetáz downregulációjáért, a VEGF, az ET-ek, a TGF- β (transzformáló növekedési faktor β) és a NADPH-oxidáz upregulációjáért – amelyek hozzájárulnak a diabetes komplikációinak kialakulásához. Kettes típusú DM-ben megfigyelték a DAG szint emelkedését a retina, az aorta és szív vaszkuláris sejtjeiben, a vese glomerulusaiban (Noh and King, 2007).

Hasonlóan a három részletezett útvonalhoz, normál állapotban a sejtek által felvett glükóz csak kis hányada lép be a **hexózamin** útba. A reakcióút végén az UDP-N-acetilglükózamin mennyisége megnő, ami az Sp1 transzkripciós faktor aktiválásán keresztül a plazminogén aktivátor inhibitor-1 és TGF- β megváltozott génexpressziójához vezet. Végeredményben a hexózamin útvonal fluxusának emelkedése hozzájárul a diabetes mikrovaskuláris szövődményeinek kialakulásához (Du et al., 2000).

A fent részletezett metabolikus utak tehát jelentős szerepet vállalnak a hiperglikémia okozta sejt- és szövetkárosodásban. Az egymással párhuzamosan végzett kutatások sokáig önállóan vizsgálták az egyes útvonalakat, és nem volt tisztázott, hogy mi a közös bennük. A kétezres évek elején bizonyították, hogy a közös tényező, amely mind a 4 metabolikus útvonal esetében megfigyelhető, a reaktív oxigénformák megemelkedett szintje. A ROS-ok a sejtek makromolekuláival kölcsönhatásba lépnek és megváltoztatják azok funkcióit. Nukleinsavakkal való reakcióik a DNS károsodásához vezetnek. DNS károsító hatásuk révén aktiválják a DNS hibajavításában fontos szerepet játszó poli(ADP-ribóz) polimerázt (PARP), amely a glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) gátlásán keresztül egyfajta pozitív visszacsatolásként a fent részletezett patofiziológiai folyamatok felé tolja el a glükózmetabolizmust (13. ábra) (Brownlee, 2001).



13. ábra A krónikus hiperglikémia által aktivált főbb molekuláris útvonalak (az ábra jobb oldala), valamint a glükóz metabolizmusa fiziológias körülmények között (az ábra bal oldala)

AGEs: Késői glikációs végtermékek, **DAG:** Diacilglicerol, **DHAP:** Dihidroxi-aceton-foszfát, **GAPDH:** Glicerinaldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz, **GFAT:** Glutamin: fruktóz-6-foszfát-amidotranszferáz, **GlcNAC:** N-acetil-glükózamin, **GLUT-1:** Glükóz transzporter-1, **GLUT-4:** Glükóz transzporter-4, **PARP:** poli (ADP-ribóz) polimeráz, **ROS:** Reaktív oxigén származékok

(Brownlee et al., 2005. alapján saját szerkesztés)

4. Anyag és módszer

4.1. A tisztított antocianin frakció előállítása

A sejtenyésztési kísérletek során vizsgált TAF Dr. Homoki Judit Rita doktori munkájának eredménye és a Debreceni Egyetem Élelmiszertechnológiai Intézete bocsátotta rendelkezésemre. Az előállítását érintő kísérletek nem kapcsolódnak szorosan kutatásaimhoz, ezért az alábbiakban csak érintőlegesen ismertetem azokat. A meggy mintákat liofilizálás után porítottuk, majd metanol:víz:ecetsav=25:24:1 arányú elegyével kevertettük MSH 300 mágneses keverő (BIOSAN, Riga, Lettország) alkalmazásával. A szűrés és az oldószer bepárlása után SPE-val (solid phase extraction: szilárd fázisú extrakció) tisztítottuk a mintákat Supelclean ENVI-18 oszlopok alkalmazása mellett. A TAF egyes komponenseit standardok segítségével Cromaster Ultra Rs (Hitachi, Tokió, Japán) HPLC készülékkel azonosítottuk Phenomenex Kinetex XB.C18 (100/4,6, 2,6 μm) oszlopot és gradiens elúciót alkalmazva. Az 5.2.1. részben bemutatott vonatkozó kromatogram a „Debreceni bőtermő” fajta mintaelőkészítése utáni HPLC analízis eredménye. A sejtenyésztési kísérleteket érintő hatóanyag kezelések is a „Debreceni bőtermő” TAF-jával történtek. A vizsgált meggyfajtát a Pallagi Kertészeti Kísérleti Teleptől kaptuk.

4.2. Allitiamin referenciaanyag előállítása

4.2.1. Az allitiamin szintézise

Az allitiamin szintézisét Matsukawa és munkatársai kísérletei alapján (Matsukawa et al., 1953) – kisebb módosításokkal – valósítottuk meg. A szintézis első lépésében allil-kloridot toluolban, nátrium-tioszulfátot pedig vízben oldottunk fel. A két oldatot elegyítettük és 24 órán át 25 ° C-on kevertettük. A szerves és a vizes fázis maximális keverhetőségének biztosítása érdekében tetrabutil-ammónium-klorid fázistranszfer katalizátort adtunk az elegyhez. A 24 órás kevertetést követően képződött allil-tioszulfátot 40°C-on, 72–77 mbar nyomáson vákuum bepárlóval bepároltuk (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Svájc). A visszamaradt frakciót –20 °C-on tároltuk a további felhasználásig. A következő lépésben tiamin-hidrokloridot vízben oldottunk 60 °C-on. A tiazol gyűrű nyitásához lúgos környezetet (pH=9) biztosítottunk NaOH folyamatos adagolása mellett.

4.2.2. Az allitiamin tisztítása HPLC-vel

A folyadékkromatográfiás mérésekhez légmentesítő egységgel, kétcsatornás pumpával (L7100,) automata mintaadagolóval (L-7250), diódasoros detektorral (L-7455) felszerelt LaChrom típusú HPLC készüléket (Hitachi, Tokió, Japán) alkalmaztunk. A szintetikus elegy elválasztásához fordított fázisú LiChroCART C18 oszlopot (250/10, 12 μm) és a következő gradiens elúciós programot használtuk 3 ml/perc áramlási sebesség mellett: 0-5 perc 100% A, 5-10 perc 90% A, 10-30 perc 65% A, 30-35 perc 38% A, 35-50 perc 100% A.

- A eluens: 500 ml víz, ami 0,011 M KH_2PO_4 -ot tartalmazott; pH = 4,5.
- B eluens: 500 ml metanol.

A komponenseket 250 nm-es hullámhosszon detektáltuk.

4.2.3. A tisztított allitiamin MALDI-TOF MS vizsgálata

A MALDI-TOF MS méréseket BIFLEX III típusú, repülési idő (TOF) tömeganalizátorral felszerelt tömegspektrométerrel (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) végeztük. Az allitiamin MALDI spektrumát pozitív ion módban vizsgáltuk. A mintamolekulák deszorpciójára/ionizálására LSI típusú impulzus üzemmódban működő N_2 UV-lézert (337 nm) alkalmaztunk. 19 kV gyorsítófeszültség és 20 kV reflektoron feszültség felhasználásával több (legalább 100) lézer felvétel spektrumait összegeztük. A mérések során külső kalibrációt alkalmaztunk, melyhez a 6-8 polimerizációs fokú ciklodextrinek $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z: 995,31, m/z: 1157,36 és m/z: 1319,41 Da csúcsait használtuk fel. A spektrum 2,5-dihidroxi-benzoészav mátrixszal készült. A mintákat etanolban oldottuk. A protonált részecskének megfelelő kvázi molekulaionokat monoizotópos felbontásban vizsgáltuk. A protonált allitiamin addukt számított pontos tömege $[\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2+\text{H}]^+$ m/z=355,13 Da. Az összehasonlításhoz használt számított értékeket az IUPAC pontos izotóp súlyaiból származtattuk Bruker XMASS 5.0 szoftver segítségével.

4.2.4. Tisztított allitiamin NMR vizsgálata

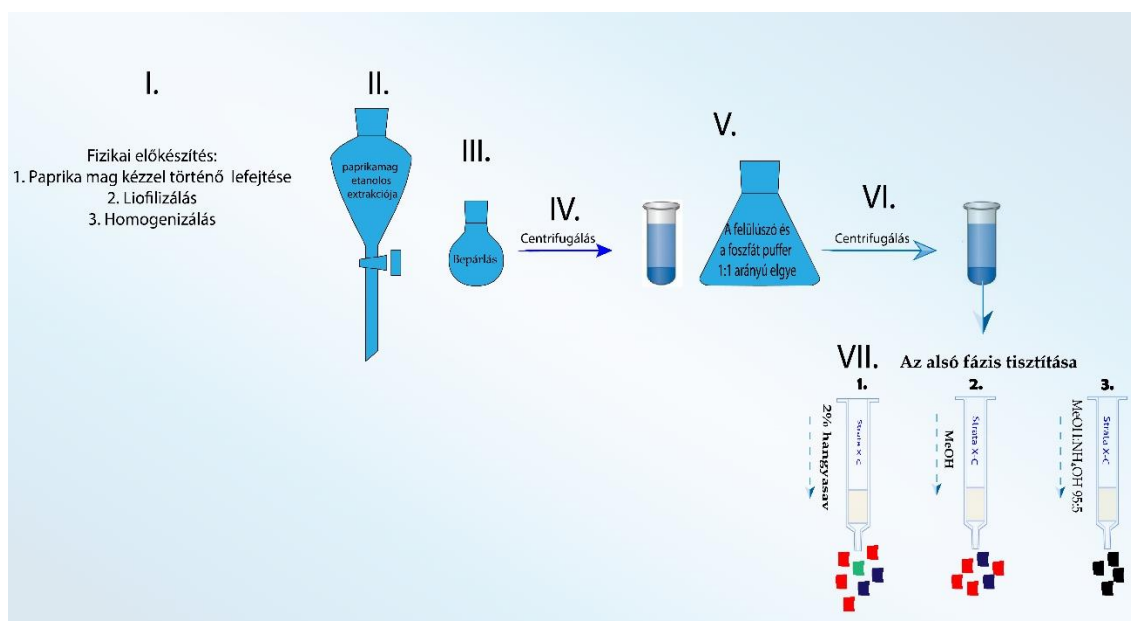
Az allitiamin szerkezetigazolására vonatkozó NMR felvételeket Bruker Avance II 500,13 MHz ^1H rezonancia frekvenciájú NMR spektrométerrel készítettük (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA). A vizsgálatok során txi-gradiens szondát alkalmaztunk 298 °K hőmérsékleten. Oldószerként deuterált metanolt (metanol-D₄) használtunk, a

kémiai eltolódásokat pedig a maradék oldószer szignálokhoz viszonyítottuk (3,33 és 47,65 ppm ^1H , illetve ^{13}C esetén). Minden kísérlet esetén a jel hozzárendeléséhez 2D COSY (correlation spectroscopy, korrelációs spektroszkópia), HSQC (heteronuclear single quantum coherence, heteronukleáris egykvantum koherencia) és HMBC (heteronuclear multi-bond correlation, többkötéses heteronukleáris korreláció) spektrumokat rögzítettünk, felhasználva a Bruker szoftverkönyvtárában található impulzusprogramokat.

4.3. Az allitiamin vizsgálata a paprikamag etanolos extraktumában

4.3.1. A paprikamag minta előkészítése

A kísérletek során „kápia” fajtákkal dolgoztunk, amiket az egyik élelmiszerkereskedelemmel foglalkozó multinacionális cégtől vásároltunk. A paprikamag minták előkészítését vázlatosan szemlélteti a 14. ábra.



14. ábra A paprikamag minták előkészítésének sematikus ábrája

MeOH: Metanol, **NH₄OH:** Ammónium-hidroxid

A paprika magját kézzel fejtettük le a zöldség húsáról. A magokat 24 órán keresztül ALPHA 1-4 LSC készülékkel liofilizáltuk (CHRIST, Osterode am Harz, Németország) és felhasználásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Ezt követően a magokat egyszerű kávédarálóval homogenizáltuk. Az így kapott mintákat MSH 300 mágneses keverő (BIOSAN, Riga,

Lettország) segítségével 1 órán keresztül etanolban kevertettük. Az oldószert vákuum bepárlóval (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Svájc) 40 °C-on, 175 mbar nyomáson pároltuk addig, amíg olajcseppek nem jelentek meg a mintában. Ezután a mintákat 5 percig, 10 000 min⁻¹ sebességgel centrifugáltuk Ohaus Multi FC5816R készülék (OHAUS, Uster, Svájc) segítségével. Ezt követően a felülúszót 1:1 arányban foszfát pufferrel (pH=3) elegyítettük, majd a mintákat újból centrifugáltuk az előző paraméterek mellett. A további kísérletekben az alsó fázist használtuk a SPE-hoz. Strata-X-C kationcserélő oszlop segítségével frakcionáltuk a mintákat. Az oszlopokat kondicionáltuk; először 6 ml metanollal, majd 6 ml foszfát pufferrel (pH=3). Ezt követően 1,5 ml mintát vittünk a töltetekre, amit 2%-os hangyasavval, majd metanollal, végül 5% NH₄OH-t tartalmazó metanollal eluáltunk. Utóbbi frakciót összegyűjtöttük és bepároltuk.

4.3.2. A paprikamag kivonat HPLC-s vizsgálata

A mérésekhez a 4.2.3. részben ismertetett LaChrom típusú HPLC készüléket (Hitachi, Tokió, Japán) alkalmaztunk. A SPE utolsó frakcióját 100 µl etanolban oldottuk fel a HPLC analízis előtt. Az elválasztás során Supelcosil LC-8 DB oszlopot (150/4,1, 5µm) és a következő gradiens elúciós programot használtunk: 0-5 perc 100%A, 5-10 perc 90%A, 10-30 perc 65%A.

- A eluens: 500 ml víz, ami 0,011 M KH₂PO₄-ot tartalmazott; pH = 4,5.
- B eluens: 500 ml metanol.

Az áramlási sebesség 1 ml/perc volt. A komponenseket 250 nm-es hullámhosszon detektáltuk.

4.3.3. A paprikamag kivonat HPLC-MS/MS vizsgálata

A paprikamag etanolos extraktumát – SPE módszerével történő tisztítását követően – a 3.3.2. részben ismertetett kromatográfiás módszerrel tisztítottuk. Az egyes frakciókat HPLC-MS/MS módszer alkalmazásával fragmentáltuk, igazolandó az allitiamin paprikamagban való akkumulációját. A fragmentációs kísérletekhez egy Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000RS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) készülékhez kapcsolt, fűthető elektropray ionizációs rendszerrel ellátott Thermo Q Exactive Orbitrap tömegspektrométert (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) használtunk. A tömegspektrométer előtti fordított fázisú

kromatográfiás elválasztást egy Thermo Accucore C18 oszlopon (100/2,1, 2,6 μm) valósítottuk meg. A következő eluenseket alkalmaztuk:

- A eluens: vizes oldat, amely 500 ml-enként 10 ml metanolt, 0,5 ml hangyasavat és 2,5 mM ammónium-formiátot (pH 2,7) tartalmazott.
- B eluálószer metanolos oldat, amely 500 ml-enként 10 ml vizet, 0,5 ml hangyasavat és 2,5 mM ammónium-formiátot (pH 2,7) tartalmazott.

A vizsgálatok során 1:1 arányú izokratikus elúciós programot használtunk 0,2 ml/perces áramlási sebesség mellett.

A tömegspektrométer mérési paraméterei a következők voltak: kapilláris hőmérséklet: 320 °C, kapilláris feszültség: 4,0 kV, a felbontást 70000-re állítottuk. A mért tömegtartomány 100-1000 m/z. A maximális befecskendezési idő: 100 ms. Az allitiamin fragmentációját pozitív ion módban monitoroztuk, az ütközési energia 40 NCE volt.

A 4.2.-től a 4.3.3. fejezetig terjedő részekben bemutatott módszerek protokolljait az Élelmiszertechnológiai Intézet kutatócsoportja bocsátotta rendelkezésemre.

A fentiekben bemutatott kísérletekhez (4.1.-4.3.); a növényi minták előkészítéséhez, az allitiamin szintéziséhez és a műszeres analitikai vizsgálatokhoz szükséges reagenseket a Sigma cégtől szereztük be (MilliporeSigma, St. Louis, Missouri, USA), ahogyan a HPLC-s elválasztások során alkalmazott kromatográfiás oszlopokat is. Utóbbi kategória alól kivételt képeznek a Thermo Accucore C18 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) és a Phenomenex Kinetex (Phenomenex, Torrance, Kalifornia, USA) oszlopok.

4.4. HUVEC sejtek izolálása és tenyésztése

A sejttenyésztést érintő kísérletek során használt médiumok és pufferek összetétele:

- PBS (Phosphate Buffered Saline) (Biosera, Nuaille, Franciaország): 200 mg/l kálium-klorid, 200 mg/l kálium-foszfát, 8000 mg/l nátrium-klorid, 1150 mg/l nátrium-foszfát.
- HBSS (Hank's Balanced Salts Solution) (Biosera, Nuaille, Franciaország): 185 mg/l kalcium-klorid, 97,67mg/l magnézium-szulfát, 400 mg/l kálium-klorid, 60 mg/l kálium-foszfát, 350 mg/l nátrium-hidrogén-karbonát, 8000 mg/l nátrium-klorid, 47,88 mg/l nátrium-foszfát, 1000 mg/l D-glükóz, 11 mg/l fenolvörös nátrium sója.

- EBM-2 komplett médium: A komplett médiumot a gyártó instrukciói alapján készítettük el, összetétele: EBM-2 alap táptalaj (katalógusszám: CC-3156) + EGM-2 SingleQuots, különböző faktorokat tartalmazó kit (katalógusszám: CC-4176): A kit tartalmát a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat: Az EBM-2 komplett médium összetétele

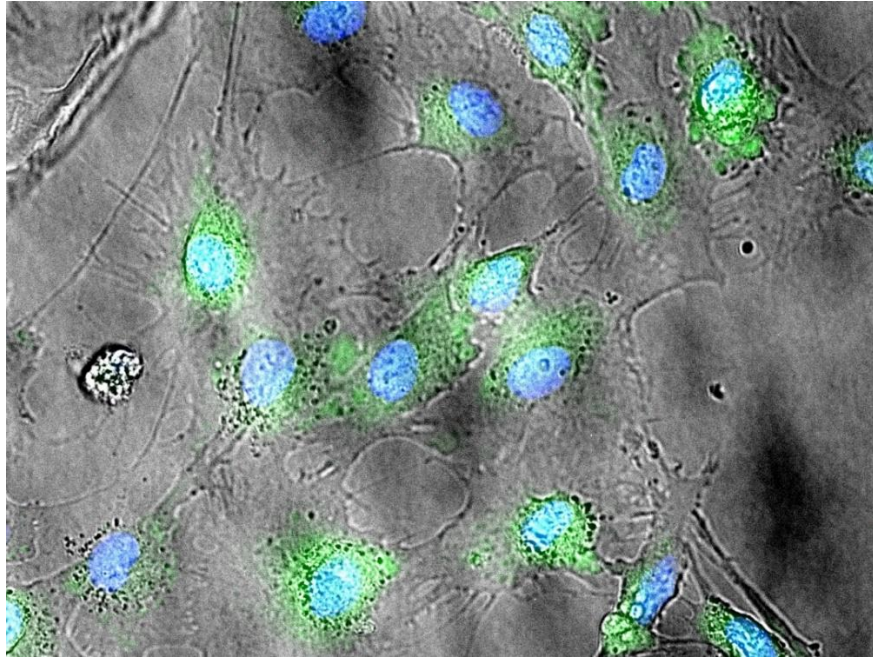
Katalógusszám	Faktor neve
CC-4101A	FBS: (fetal bovine serum, magzati szarvasmarha szérum)
CC-4112A	hidrokortizon
CC-4113A	hFGF: (human fibroblast growth factor, fibroblaszt növekedési faktor)
CC-4115A	VEGF: (vascular endothelial growth factor, vaszkuláris endotheliális növekedési faktor)
CC-4116A	Aszkorbinsav
CC-4117A	hEGF: (epidermal growth factor, epidermális növekedési faktor)
CC-4381A	Gentamicin/Amphotericin B
CC-4396A	Heparin

- Szupplementált M199 médium; továbbiakban M199 médium: M199 sejttenyésztő tápoldat (Biosera, Nuaille, Franciaország), ami tartalmaz: 10 % hőinaktivált FBS, 10 % EBM-2 komplett médiumot, 2 mM glutamint, 59,88 µg/ml penicillin G-t, 100 µg/ml sztreptomycin, 2,5 mg/l amphotericin B-t.

Az ismertett hatóanyagok fent említett kórélettani állapotokra való hatását HUVEC (human umbilical vein endothelial cells: humán köldökzsinór véna endothel sejtek) sejt kultúrán végeztem. A köldökzsinórokat a Debreceni Egyetem Nőgyógyászati Klinikájáról kaptuk. A humán eredetű köldökzsinórokat érintő vizsgálatokat a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően végeztük el, a protokollt pedig a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága hagyta jóvá (regisztrációs szám: RKEB / IKEB 3712-2012). A köldökzsinórokat PBS-ben tároltuk, az izolálás előtt 70%-os etanolban fertőtlenítettük. Első lépésben az ép köldökzsinór vénát mindkét végén kanuláltuk, majd HBSS pufferrel mostuk és vérmentesítettük azt. Ezt követően 20 percig 37 °C-on kollagenáz (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Németország) oldattal (1,5 mg/ml, 22U/100ml) inkubáltuk a vénát. Az érfalról leemésztett sejteket tartalmazó enzim oldatot M199 médiummal mostuk ki. Az így nyert sejt szuszpenziót egy Ohaus Multi FC5816R

készülékkel 1000 min^{-1} sebességgel 8 percig centrifugáltuk (OHAUS, Uster, Svájc). A felülúszót leszívtuk, majd a sejtpelletet óvatosan M199 médiumban szuszpendáltuk, ezt követően 75-ös sejttenyésztő flaskába szélesztettük a sejteket. A 5%-os CO_2 atmoszférát és a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -os tenyésztési körülményeket egy Galaxy 170 R inkubátorban (Eppendorf, Hamburg, Németország) valósítottuk meg. A sejtek letapadását segítő minden sejttenyésztő műanyag terméket az izolálást megelőzően 0,5%-os zselatinoldattal 4-8 órán keresztül inkubáltunk. A sejt kultúrákat addig tenyésztettük, míg a sejtréteg konfluenciája el nem érte a 80-100%-ot, majd kétszeres alapterületre passzáltuk a sejteket. A passzálás során leszívtuk a sejtekről az M199 médiumot, majd steril PBS oldattal mostuk a sejtréteget. A sejtek, valamint a sejtek és a hordozó közötti kapcsolatokat tripszin-EDTA (Biosera, Nuaille, Franciaország) hozzáadásával szüntettük meg, aminek következtében a sejtek leváltak a hordozóról. Az enzim reakciót négyszeres térfogatú M199 médiummal állítottuk le. A sejteket 50 ml-es centrifugacsövekbe pipettáztuk, majd 1000 min^{-1} sebességgel centrifugáltuk, végezetül szélesztettük őket (Crampton et al., 2007). A kór állapotok modellezésére gyulladás okozta endothel diszfunkció esetén 100 ng/ml LPS-t alkalmaztunk és 24 órás inkubációt követően vizsgáltuk a következőkben bemutatott markereket. A hiperglikémia okozta endothel diszfunkció esetén pedig 30 mmol/l glükózt alkalmaztunk majd 6, 12, 24 órás, valamint egyhetes inkubációkat követően vizsgáltuk az alábbiakban bemutatott markereket.

A 15. ábra illusztrálja a HUVEC monolayer-t karboxifluoreszcein szukcinimidil észter (CFSE) és NuclBlue (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) festést alkalmazva fluoreszcens és világos látóterű felvételeinek kompozit képében. A képeket Olympus UPlanFl 40x NA 0.75 objektívvel, Olympus DP71 színes kamerával felszerelt Olympus IX71 mikroszkóppal készítettük és Olympus Cell[^]B szoftverrel értékeltük ki (Olympus Life Science, Waltham, Massachusetts, USA).



15. ábra NuclBlue és CFSE festett HUVEC sejtek fluoreszcens és világos látóterű mikroszkópos felvételeinek kompozit képe.

4.5. Az endothel sejtek karakterizálása flow citometriás analízissel

Az izolálást követően a sejteket fenotipizáltuk annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk, a kísérletek során egyértelműen endothel sejtekkel, nem pedig a köldökzsínór vénáját alkotó más sejtípusokkal végezzük kísérleteinket. Az endothel sejtek azonosításához a sejteket egerekben termeltetett, fluorofórral konjugált, monoklonális antitestekkel jelöltük, melyek a következők voltak:

- FITC-CD31: fluoreszcein-izotiocianáttal jelölt platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)
- PE-CD54: fikoeritrinnel jelölt intercellular adhesion molecule (ICAM-1)
- APC-CD106: alofikocianinnal jelölt vascular cell adhesion molecule (VCAM-1)
- PerCP-Cy5.5-CD45: peridinin klorofil A protein komplex – Cy5.5 tandem fluoreszcens festékkel jelölt leukocyte common antigen (LCA).

A karakterizálás során alkalmazott antitesteket a Becton Dickinson vállalattól szereztük be (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA).

A sejteket a passzálásnál leírtak szerint kezeltük, majd a centrifugálás után a sejtszámlálást Bürker kamrával (Hirschmann Laboratory, Eberstadt, Németország) valósítottuk meg. 5 000 000 sejt/ml szuszpenzióból 20 μ l-t pipettáztunk 6 darab 1,5 ml-es centrifugacsőbe. Ezek közül az elsőbe nem pipettáztunk antitestet, ez szolgált negatív

kontrollként. 4 centrifugacsövet egyszeresen jelöltünk a fent megnevezett antitestek 20 μ l-ének sejtszuszpenzióba való pipettázásával. Egy centrifugacső sejtjeit mind a 4 antitesttel jelöltük. A centrifugacsövek térfogatát M199 médiummal 100 μ l-re egészítettük ki, figyelembe véve, hogy a mérésekhez szükséges sejtdenzitás megközelítőleg 1 000 000 sejt/1 ml. A fluorszcens festékekkel jelölt antitestekkel 30 percig, szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk a sejteket. Ezt követően háromszor mostuk azokat M199 médiummal. Az áramlási citometriás méréseket Becton Dickinson FACS Aria III Cell Sorter (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) alkalmazásában végeztük.

A FITC-t és a PerCP-Cy5.5-et 488 nm-es lézerrel gerjesztettük. A FITC által kibocsátott zöld fényt 530/30 sávszűrővel detektáltuk, míg a PerCP-Cy5.5 távoli vörös fluoreszcenciáját 635 nm-es dikroikus tükör és 695/40 sávszűrő segítségével mértük. A PE-t egy szilárdtest-lézerrel, 562 nm-en gerjesztettük, az emittált fényt pedig 595/50 nm-es sávszűrővel detektáltuk. Az APC-t 635 nm-es vörös lézerrel gerjesztettük, a kibocsátott fény intenzitását egy 660/20 sávszűrővel detektáltuk. Az adatokat FCS Express 4 Research Edition szoftver (De Novo Software, 7. verzió, Glendale, CA, USA) alkalmazásával elemeztük (Betters, 2015).

4.6. A sejtek életképességének meghatározása MTT-assay-vel

A sejtek életképességének vizsgálatára kifejlesztett és általánosan használt módszer az MTT-assay, melynek lényege, hogy a metabolikusan aktív sejtek felveszik a sárga színű tetrazólium-bromid festéket (MTT: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazólium-bromid) (Duchefa Biochemie, Haarlem, Hollandia), amelyet a sejt mitokondriális oxidoreduktáz enzimjei formazán kristályokká alakítanak át. A formazán kristályok lila színűek, izopropilalkoholban való visszaoldás után a színintenzitás fotometriásan mérhető. Ez a színintenzitás arányos az élő sejtek számával, végeredményben a sejtek életképességével.

Az alkalmazott hatóanyagoknak a sejtek viabilitására gyakorolt hatását MTT-assay-vel értékeltük. A sejteket 96 lyukú plate-re helyeztük (2×10^4 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. A médium leszívása után a sejteket 100 μ l 0,5 mg/ml MTT-oldattal inkubáltuk 37 °C-on 3 órán keresztül. Ezt követően az MTT-oldatot eltávolítottuk, az inkubációs idő alatt keletkezett kristályokat pedig izopropil-

alkoholban oldottuk fel, az oldatok abszorbanciáját 565 nm-en mértük Clariostar micro plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) alkalmazásával. Az eredményeket a kontroll (kezeletlen) csoport százalékában fejeztük ki (Oláh et al., 2016).

4.7. Az apoptotikus folyamatok vizsgálata

Az apoptotikus események vizsgálatára DiIC₁(5) fluoreszcens festéket (Enzo Biochem, Inc., Farmingdale, New York, USA) használtunk. A módszer lényege, hogy a festék a mitokondriális membránpotenciál függvényében akkumulálódik a sejtek mitokondriumainak intermembrán terében, következésképpen minél kisebb a festék intenzitása, annál nagyobb a korai apoptotikus jeleket mutató sejtek aránya.

A kísérleteket 96 lyukú plate-en végeztük (2×10^4 sejt/lyuk). A megfelelő hatóanyagok különböző dózisaival kezeltük a sejteket 24 és 48 órán keresztül a TAF, 24, 48 és 72 órán keresztül az allitiamin esetében. A sejtekről eltávolítottuk a médiumot, majd a fluoreszcens festék 1 μ M-os oldatával inkubáltuk a sejteket 30 percig, 37 °C-os hőmérsékleten (50 μ l/lyuk). Az inkubáció után a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd detektáltuk a fluoreszcencia intenzitásokat Clariostar micro plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) segítségével (gerjesztés: 630 nm, emisszió: 670 nm). A kísérletek során az apoptózis pozitív kontrolljaként karbonil cianid m-klorofenilhidrazont (CCCP) alkalmaztunk (Zákány et al., 2018).

4.8. A nekrotikus események értékelése

A nekrotikus folyamatok vizsgálatát SYTOX Green fluoreszcens festék (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, USA) segítségével végeztük. A festék csak a súlyosan sérült, dezintegrálódott membránokon keresztül képes átjutni, ahol képes a duplaszálú DNS-hez kötődni. Az ép membránokkal rendelkező sejtekbe való bejutása nagymértékben limitált. Ennek következtében az ép sejtek esetében alacsony, míg a nekrotikus sejtek esetében magasabb intenzitás detektálható.

A sejteket 96 lyukú plate-re szélesztettük (2×10^4 sejt/lyuk), majd a vizsgált hatóanyagok eltérő koncentrációival kezeltük őket 24 és 48 órán keresztül a TAF, 24, 48 és 72 órán keresztül az allitiamin esetében. A médium leszívását követően a fluoreszcens festék 1 μ M-os oldatával inkubáltuk a sejteket 30 percig, 37 °C-os hőmérsékleten. Minden lyukba 50 μ l festékoldatot pipettáztunk. Az inkubációs idő letelte utána a sejteket PBS-sel kétszer mostuk, majd Clariostar micro plate reader (BMG Labtech, Ortenberg,

Németország) segítségével 490 nm-en gerjesztve 520 nm-en detektáltuk a fluoreszcencia intenzitásokat. Az eredményeket a kontroll (kezeletlen) csoport százalékában fejeztük ki. A kísérletek során a nekrozis pozitív kontrolljaként RIPA (radioimmuno precipitation assay) lizis puffert alkalmaztunk (Ramot et al., 2018).

4.9. Az intracelluláris ROS tartalom mérése

Az intracelluláris ROS tartalom mérésére széles körben alkalmazott fluoreszcens festék a 2',7'-diklór-fluorescein-diacetát (DCFDA) (MilliporeSigma, St. Louis, Missouri, USA). A mérés lényege, hogy a nem fluoreszcens DCFDA az acetátcsoportok intracelluláris észterázokkal történő lehasításával és reaktív oxigénformák általi oxidációjával átalakul erősen fluoreszcens 2',7'-diklór-fluoresceinné (DCF). Az intenzitás mértéke arányos a sejtekben lévő reaktív oxigénformák mennyiségével.

A kezelések hatására bekövetkező intracelluláris ROS termelés változásának nyomon követésére 24 lyukú plate-eket használtunk. A sejteket 100 μ M végkoncentrációjú ROS-szenzitív DCFDA festékkel inkubáltuk 1 órán keresztül, 37 ° C-on, sötétben. Az inkubációt követően a sejteket kétszer mostuk PBS-sel a fölösleges festék eltávolítása érdekében. Míg a 100 μ mol/l H₂O₂-vel végzett vizsgálatok során 5 percenként monitoroztuk a sejteket – a TAF-val való kezelések esetében 60. percben, az allitiaminnal történő kezelések során a 120. percben leolvasott fluoreszcencia értékekkel kalkuláltunk – addig az LPS által indukált ROS képződés vizsgálatokor 24 óra eltelte után kapott intenzitásokat használtuk fel. Micro plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) segítségével 485 nm-en gerjesztve, 530 nm-en detektáltuk a fluoreszcencia intenzitást. Az eredményeket a kontroll (kezeletlen) csoport százalékában fejeztük ki (Eruslanov and Kusmartsev, 2010).

4.10. Reverz transzkripció és valós idejű kvantitatív polimeráz lánreakció

A totál RNS-t Extrazole-lal (Blirt, Gdańsk, Lengyelország) izoláltuk. Az RNS minőségi és mennyiségi ellenőrzését NanoDrop-pal (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) végeztük el, amely után UltraScript 2.0 cDNA Synthesis Kit (PCR Biosystems, London, Egyesült Királyság) alkalmazásával cDNS-t készítettünk. A reverz transzkripciót egy 2720 Thermal Cycler típusú készüléken végeztük el (Foster City, Kalifornia, USA).

Az általunk vizsgált gének (COX-1, a COX-2 és a PGI₂-szintáz enzimeket kódoló gének) amplifikációjához 2x qPCRBIO Probe Mix No-ROX assay-t (PCR Biosystems, London, Egyesült Királyság) használtunk. A kvantitatív valós idejű PCR (Q-PCR) reakciókat egy Roche LightCycler 480 (Hoffmann-La Roche, Bazel, Svájc) készülék segítségével valósítottuk meg. A génexpressziós szintek meghatározásánál az expressziós értékeket GAPDH génjére normalizáltuk. Minden kísérletet 3 technikai párhuzamossal végeztünk el, melyekből az expresszió változásait a $2^{\Delta\Delta C_t}$ módszerrel értékeltük ki. Az eredményeket a kontroll (kezeletlen) csoport százalékában fejeztük ki (Peirson and Butler, 2007).

4.11. Az indukált citokin-szekréción vizsgálata Luminex/MagPlex módszerrel

A kezeléseket követően a tenyészetekről a tápoldatot összegyűjtöttük, majd 10 percig $10\ 000\ \text{min}^{-1}$ sebességgel centrifugáltuk. A minták felülúszóit $-80\ ^\circ\text{C}$ -on tároltuk. 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. A módszer lényege, hogy vörös és infravörös festékekkel színezett $5\ \mu\text{m}$ átmérőjű, mágnesesgyöngyökhöz különböző fluoreszcens festékekkel jelölt monoklonális antitesteket kötnek. A műszer kapillárisán áthaladó gyöngyöket 2 különböző színű lézer világítja meg, a piros színű a gyöngy típusát, a zöld színű a fluoreszcens jel intenzitását detektálja. Utóbbi a mintában lévő – a monoklonális antitesthez kötött – analitok koncentrációjával arányos. A gyöngyök összekeverése után az analitok a microplate well-jeiben való szimultán mérése valósítható meg.

Az allitiaminnal kapcsolatos vizsgálatok során az IL-6, IL-8 és TNF- α fehérjéket kvantifikáltuk, míg a meggyel végzett kísérletek során az IL-6, IL-8, a TNF- α , GM-CSF, RANTES markerek mennyiségi meghatározását valósítottuk meg.

4.12. Glutathion intracelluláris szintjének vizsgálata

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

4.13. A transzketoláz enzim aktivitásának vizsgálata

A transzketoláz aktivitást citoszol frakcióból mértük kolorimetriás módszert alkalmazva. A reakciómix 14,8 mol/L ribóz-5-foszfátot, 253 $\mu\text{mol/L}$ NADH-t, 185 U/ml triózfoszfát-izomerázt és 21,5 U/ml glicerín-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 enzimaktivitásokat a NADH extinkciós együtthatóját használva (Berrone et al., 2006).

4.14. ELISA assay-k

4.14.1. AGEs kvantitatív meghatározása

A késő glikációs végtermékek mennyiségi meghatározása előtt a sejteket tripszines kezelés után RIPA pufferben lizáltuk, centrifugáltuk 10 percig, 10 000 min^{-1} sebességgel, majd a mintákat $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a mérésekig. Az AGEs mennyiségét OxiSelect kompetitív ELISA kitek segítségével, a gyártó protokollját követve határoztuk meg (Cell Biolabs Inc., San Diego, California, USA).

4.14.2. NF- κ B aktivitás vizsgálata

Az NF- κ B kvantifikálása előtt a mintákat hasonlóan készítettük elő, mint az AGEs mérések esetében. A méréseket Human InstantOne™ NF κ B p65 (Total) ELISA kitekkel (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornia, USA) végeztük, a gyártó instrukciói alapján.

4.14.3. A fehérje szekréció vizsgálata

A szöveti plazminogén aktivátor (tPA), a tromboxán és a prosztaciklin mennyiségi meghatározása előtt a mintákat a citokin mérésekhez hasonlóan készítettük elő. A markerek mennyiségét a sejtek felülúszójából Abcam által gyártott kolorimetriás ELISA kitek (Abcam, Cambridge, UK) segítségével határoztuk meg, a gyártó instrukciói alapján.

4.15. Statisztikai analízis

A mérési adatok rendszerezését és elsődleges feldolgozását a Microsoft Office Excel 2016-os programmal, valamint a GraphPad Prism 8.0.1 szoftverrel végeztem. A statisztikai analízisekhez One-Way variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk Bonferroni szerint módosított t-teszttel kiegészítve. Szignifikáns változásnak tekintettük,

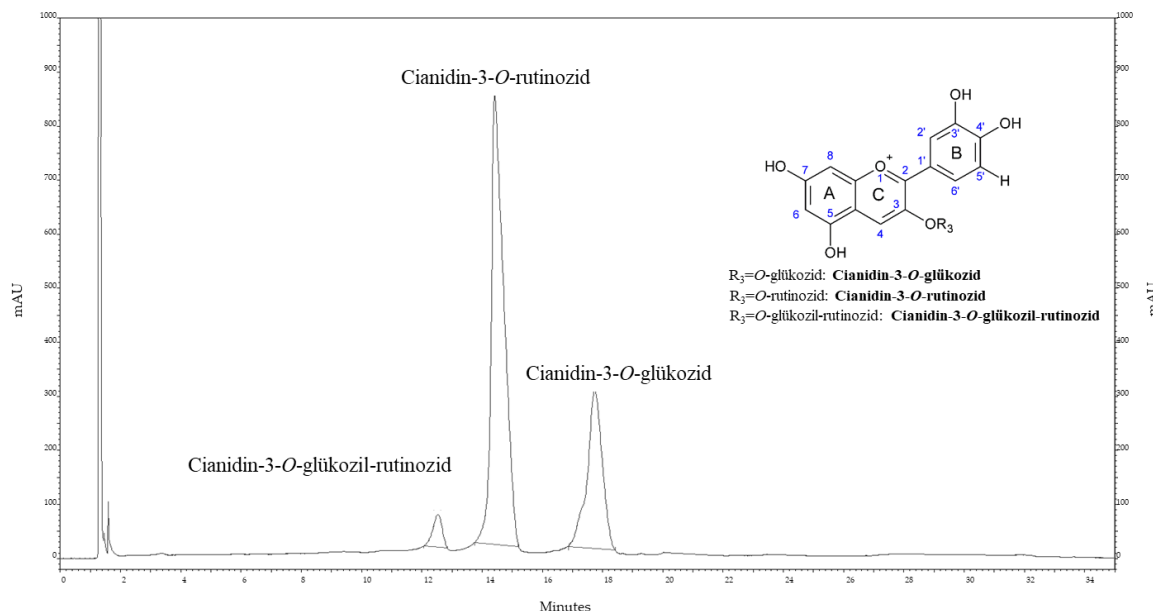
ha a kontrollhoz viszonyítva $p < 0,05$. A kísérletek során minden esetben három független mérést valósítottunk meg, ezekből egy reprezentatív ábrát tüntettünk fel az eredmények részben.

5. Eredmények

5.1. A hatóanyagok analitikai vizsgálata

5.1.1. A tisztított antocianin frakció

A TAF hatásának *in vitro* vizsgálata előtt meghatároztuk annak antocianin összetételét. Az SPE módszerrel való tisztítást követően a tisztított frakciót folyadékkromatográfiásan vizsgáltuk. A 16. ábra látható kromatogram alapján a TAF fő antocianin komponensei a cianidin-3-*O*-glükozil-rutinozid, a cianidin-3-*O*-glükozid és a cianidin-3-*O*-rutinozid. Fontos megjegyezni, hogy az egyes csúcsok által reprezentált komponensek MALDI-TOF MS-sel történő kvalitatív vizsgálata megerősítette (Homoki et al., 2016) a HPLC-s eredményeket, azonban – tekintettel arra, hogy a doktori témámhoz kapcsolódó kutatásoknak nem képezik szerves részét – ezek az adatok ebben a dolgozatban nem kerülnek bemutatásra.



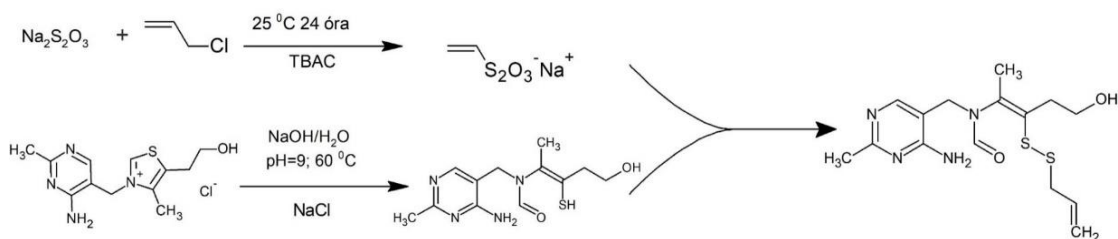
16. ábra A „*Debreceni bőtermő*” fajtából származó tisztított antocianin frakció fordított fázisú kromatogramja.
(Detektálási hullámhossz 535 nm)

5.1.2. Az allitiamin

5.1.2.1. Az allitiamin szintézise

Mielőtt az allitiamin biológiai hatását tanulmányoztuk volna *in vitro* sejtmodellünkön, annak előállítását kellett megvalósítanunk tekintettel arra, hogy kereskedelmi forgalomból nem szerezhető be a vegyület. A növényi mátrixból való nagy

volumenű izolálás komplikáltsága, laborunk kapacitása miatt a kémiai úton történő szintézisét választottuk. A 17. ábra látható a szintézis alatt idealizált reakcióútvonal – részletesen lásd 4.2.2. fejezetben – amivel egyidőben az allitiamin mellett egyéb tiaminszármazékok és további melléktermékek is keletkeztek. A következő lépésben meg kellett oldanunk a végtermékek elválasztását és az allitiamin tisztítását, amelyhez folyadékkromatográfias módszert alkalmaztunk.

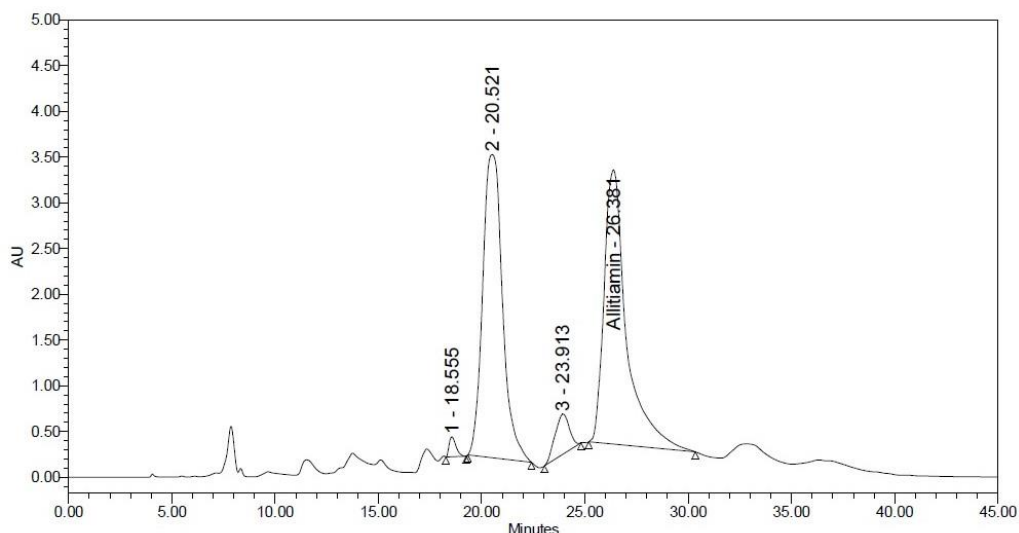


17. ábra Az allitiamin kémiai szintézisének sematikus ábrázolása.

Na₂S₂O₂: Nátrium-tioszulfát, **NaCl:** Nátrium-klorid, **NaOH:** Nátrium-hidroxid, **TBAC:** Tetrabutil-ammónium-klorid

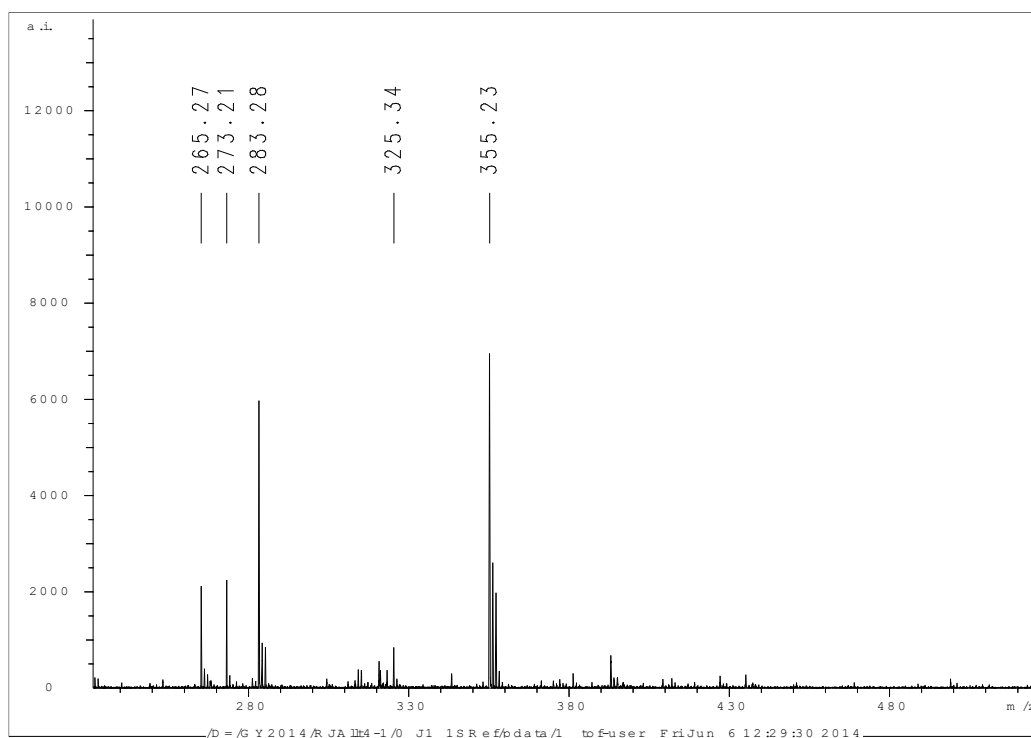
5.1.2.2. Az allitiamin szerkezetigazolásához kapcsolódó vizsgálatok

A szintetikus elegy folyadékkromatográfias vizsgálatából származó kromatogram a 18. ábra látható. Az anyag és módszer rész 4.2.2. fejezetében részletesen ismertetett szintetikus út eredményeként, valamint a kromatográfias csúcsok alapján a képződött vegyületek 39% -át azonosítottuk allitiaminként.



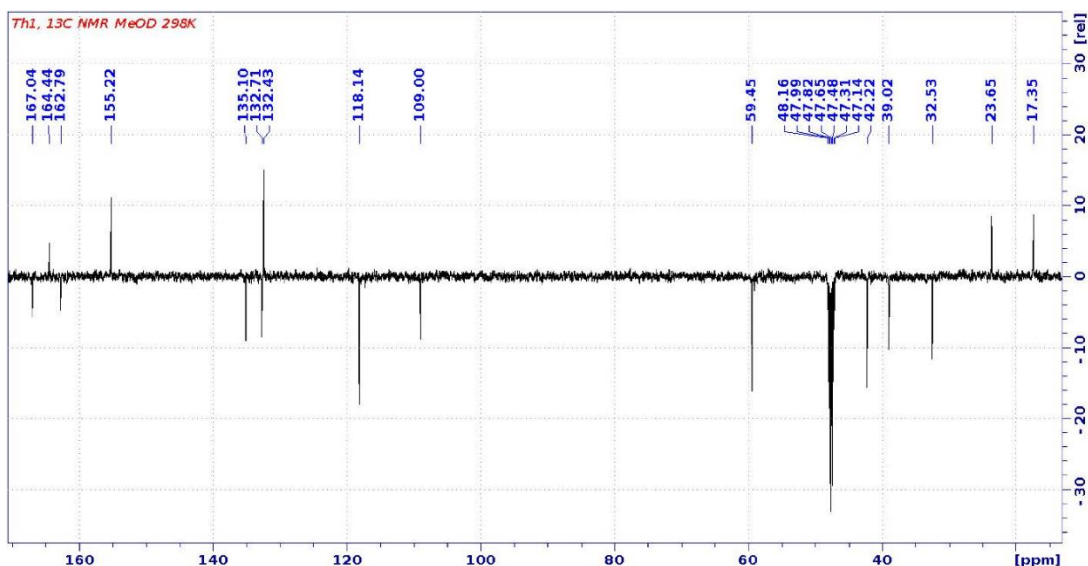
18. ábra Az allitiamin szintézise során képződött vegyületek fordított fázisú kromatogramja
(Detektálási hullámhossz 250 nm)

Az egyes csúcsok frakcióit összegyűjtöttük és további, a szerkezetükre vonatkozó analitikai vizsgálatokat végeztünk. A 19. ábra látható az izolált allitiamin MALDI-TOF MS spektruma, melyben a mért 355,23 Da jó egyezést mutat a képlet alapján számított monoizotópos m/z értékkel.



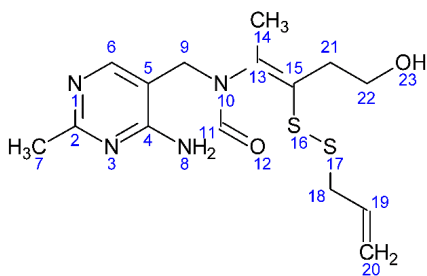
19. ábra A szintéziselegeből HPLC-vel tisztított allitiamin MALDI-TOF spektruma

A 20. ábra a tisztított allitiamin NMR spektrumát szemlélteti. A hozzárendelt kémiai eltolódások elfogadható egyezésben voltak az ACD/NMR Predictor algoritmus által számított spektrummal (20. ábra 5. táblázat).



20. ábra A szintéziselegyből HPLC-vel tisztított allitiamin ^{13}C -NMR-spektruma

5. táblázat: Az izolált vegyület szerkezetigazolása a ^1H , illetve ^{13}C NMR spektrumokban asszignált csúcsok alapján



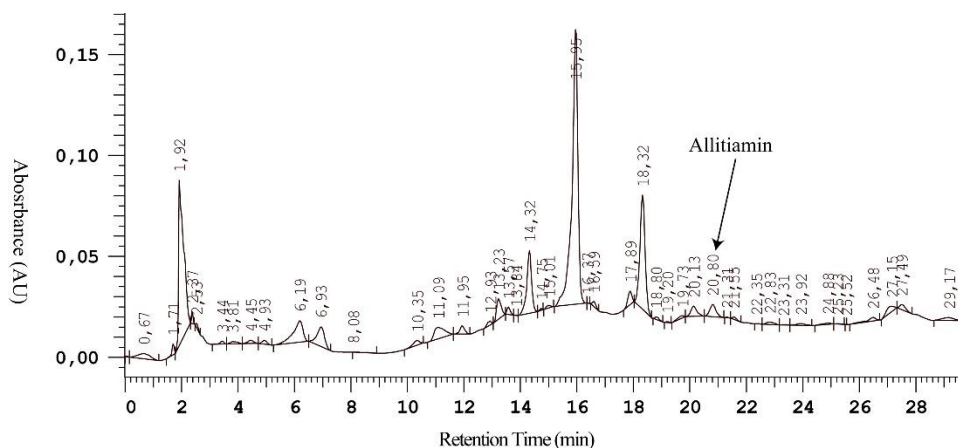
Jelölés	Csoport	^{13}C eltolódás (ppm)	^1H eltolódás (ppm)
2	C	167.04	-
11	CH	164.44	8.021 (s)
4	C	162.79	-
6	CH	152.22	7.864 (s)
15	C	135.10	-
19	CH	132.71	5.690 (m)
13	C	132.43	-
20	CH_2	118.14	5.125 (m)
5	C	109.00	-
22	CH_2	59.45	3.656 (t, $J=6.9\text{Hz}$)
18	CH_2	42.22	3.049 (d, $J=7.4\text{Hz}$)
9	CH_2	39.02	4.539 (s, broad)
21	CH_2	32.53	2.862 (t, $J=6.9\text{Hz}$)
7	CH_3	23.65	2.383 (s)
14	CH_3	17.35	2.128 (s)

Mindkét módszer egyértelműen igazolta, hogy a kromatogramon jelölt, 26,38 percnél eluálódott csúcs által reprezentált 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.

5.1.2.3. A paprikamag kivonat HPLC és HPLC-MS/MS vizsgálata

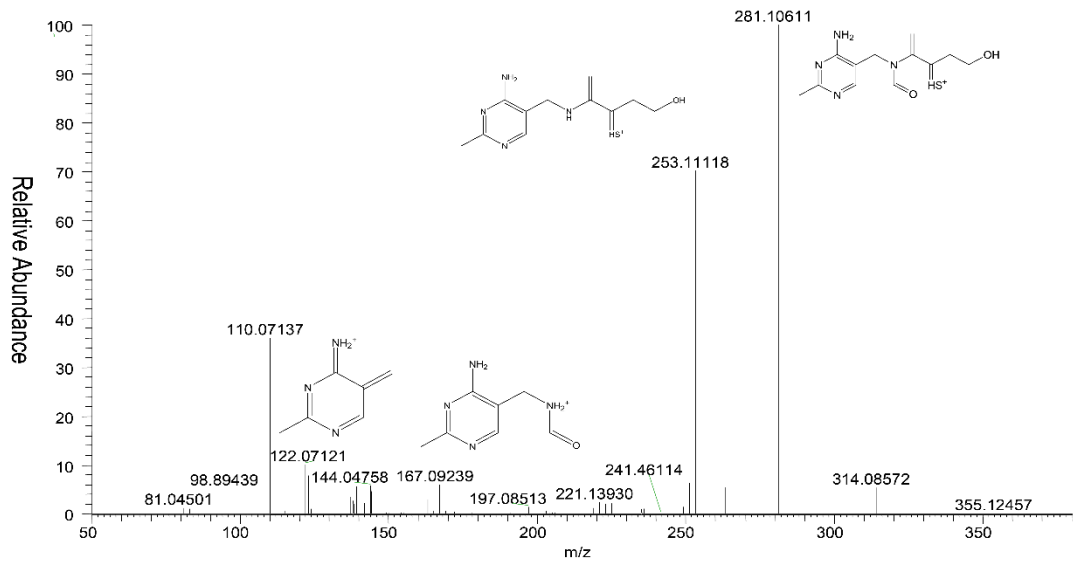
A paprikamag etanolos kivonatát a mintaelőkészítés után kromatográfiásan vizsgáltuk. Az allitiamin szintézise és tisztítása során előállított referenciaanyagot

használtuk a kvalitatív HPLC analízishez. Ennek eredményét mutatja az 21. ábra. A kromatogramon jelölt csúcs reprezentálja az allitiamint, amelynek frakcionálását követően további igazoló vizsgálatokat végeztünk.

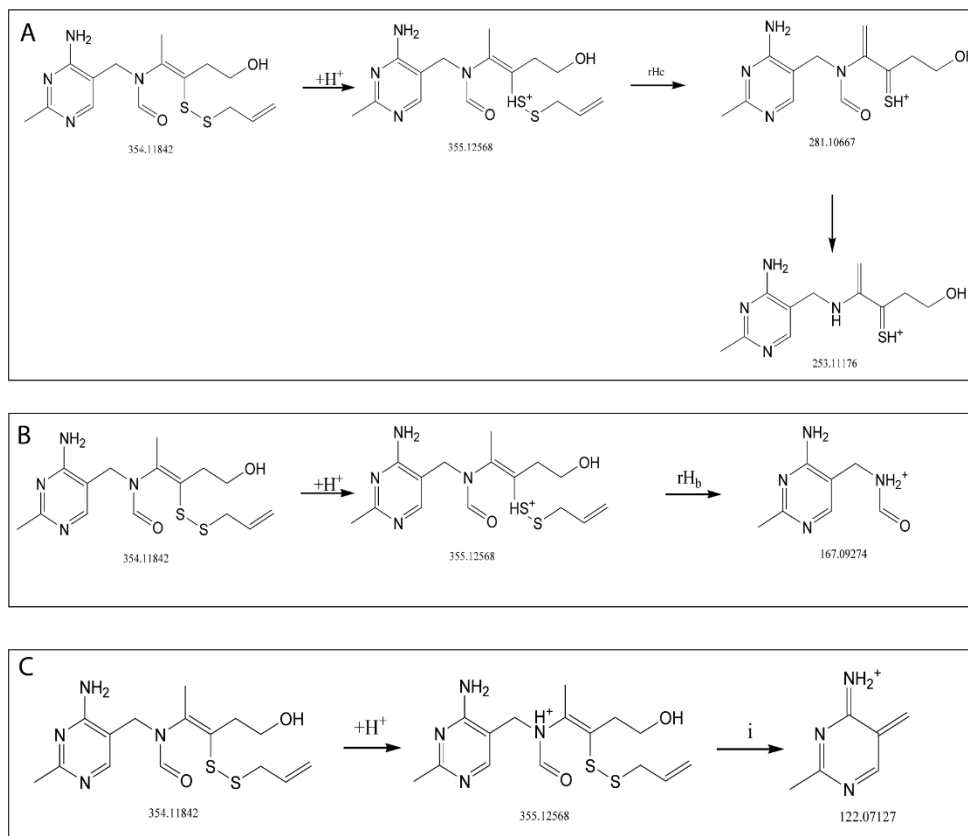


21. ábra A paprikamag etanolos kivonatának SPE-val történő tisztítását követő HPLC analízisének fordított fázisú kromatogramja
(Detektálási hullámhossz 250 nm)

A fragmentációs kísérletek során négy jellegzetes fragmensiont detektáltunk. Az allitiamin MS²-spektruma az 22. ábra látható, a legvalószínűbb fragmentációs utakat az 23. ábra összegeztük. A protonált allitiamin S-S kötésének hasadásával a 281,061 m/z-es fragmension képződött, majd a karbonilcsoport elvesztése vezetett a 253,1112 m/z értékű fragmensionhoz (23. ábra/A). A 167,0924 m/z értékű fragmension a protonált allitiamin oldalláncán található N-C kötés hasadásából származik (23. ábra/B). 122,0712 m/z értéknél kapott negyedik fragmension képződését a protonált molekula teljes oldalláncának elvesztésével értelmeztük, ami az oldallánc nitrogénatomja és a pirimidinyűrűhöz kapcsolt szénatom közötti kötés induktív hasításával megy végbe (23. ábra/C).



22. ábra A paprikamag etanolos kivonatából HPLC-vel tisztított allitiamin MS²-spektruma

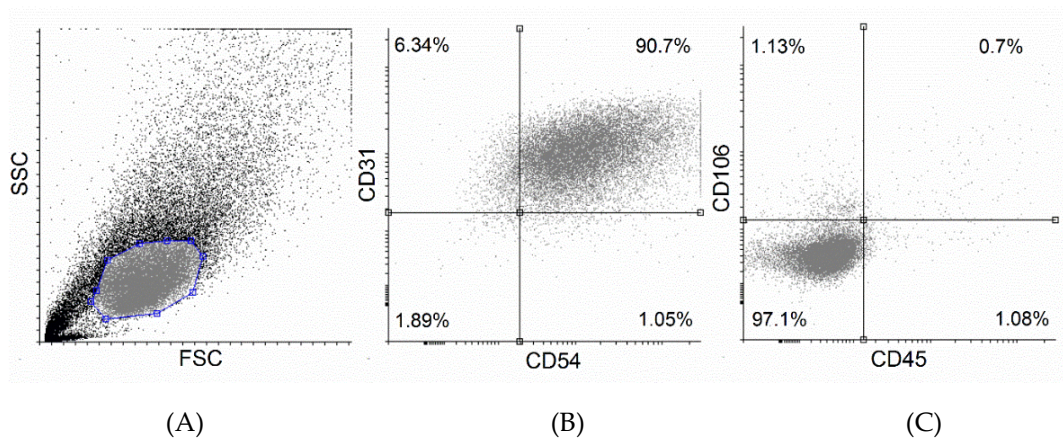


23. ábra Az allitiamin MS fragmentációs spektrumában megjelenő komponensek keletkezésének legvalószínűbb fragmentációs útjai.

5.2. Az endothel sejtek flow citometriás fenotipizálása

Tekintettel arra, hogy kísérleteink során primer sejtekkel dolgoztunk – nem pedig kereskedelmi forgalomból beszerezhető, a gyártó által karakterizált sejtvonalakkal – *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. A felsorolt sejtfelszíni markerek közül a CD31 és a CD54 konstitutív módon expresszálódik az endothel sejtek felszínén, míg a CD45-öt egyáltalán nem expresszálják az endothel sejtek, a CD106 pedig csak a citokin-stimulált endotheliumon fejeződik ki.

Amint a 24. ábra látható, az izolált endothel sejtek 90,7 %-a expresszálta a CD54 és CD31 pozitív markereket, míg a sejtek körülbelül 97% -án nem fejeződtek ki a CD45 és CD106 negatív markerek. Ezek az adatok az izolálás hatékonyságát és pontosságát igazolják és hitelesítik a további HUVEC-kel végzett vizsgálatokat.



24. ábra Endothel sejtek áramlási citometriás elemzése.

Az izolált endothel sejteket specifikus antitestek alkalmazásával ellenőriztük pozitív CD54 és CD31, valamint negatív CD45 és CD106 markerfehérjékre.

(A): Az endothel sejtek előre (FSC) és oldalra (SSC) irányuló fényszórás diagramja.

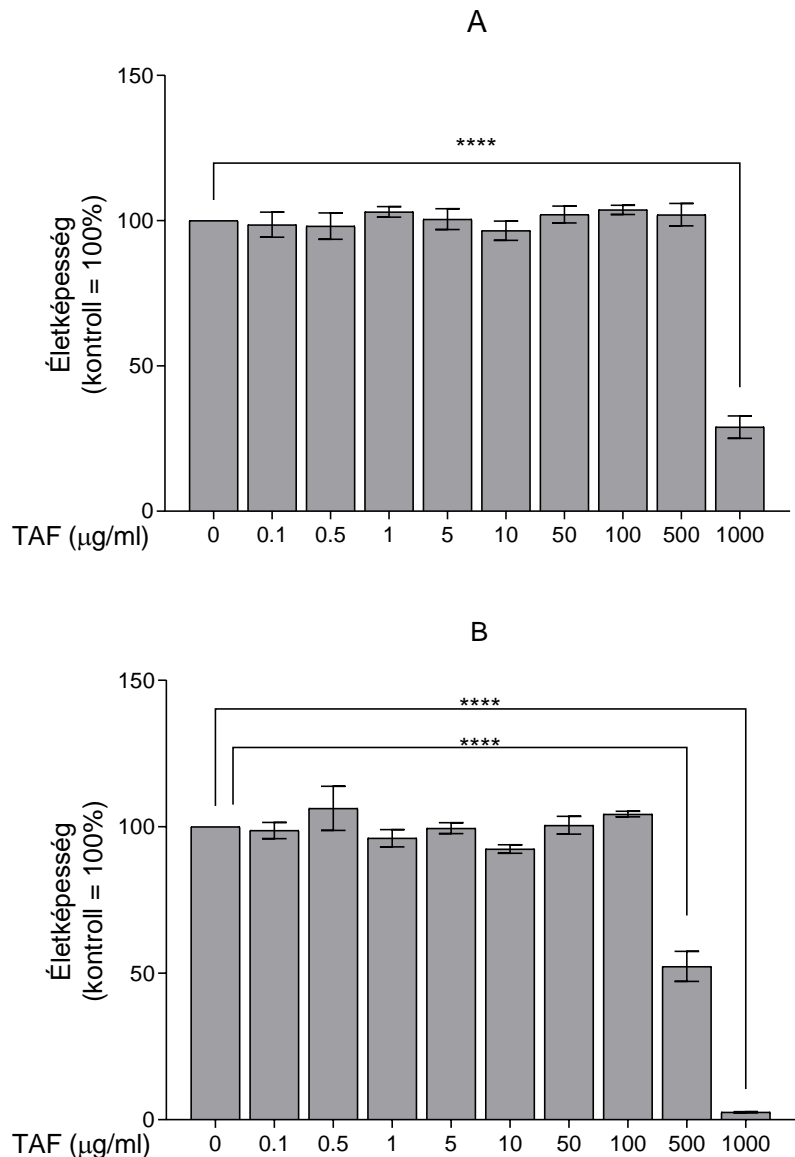
(B), (C): Az endothel sejtek pozitív (B) és negatív (C) markereinek dot-plot ábrázolása.

5.3. A TAF hatása az LPS okozta inflammatorikus folyamatokra

5.3.1. A TAF optimális koncentrációjának meghatározása

5.3.1.1. Életképességi vizsgálatok

A hatóanyagok *in vitro* vizsgálatának első lépéseként célszerű azonosítani a vizsgált hatóanyag azon koncentrációtartományát, amely a sejtek életképességét nem befolyásolja szignifikánsan. A HUVEC sejt kultúrát érintő kísérleteinket életképességi tesztek megvalósításával kezdtük. Elsőként MTT-assay-t végeztünk. Ahogy az 25. ábra oszlopdiagrammja mutatja a TAF 1-100 µg/ml koncentrációtartományban nem fejt ki negatív biológiai hatást a sejtek életképességére 24 és 48 órás mintavétel esetén sem. Magasabb koncentrációban viszont szignifikánsan csökkentette azt, 24 óra elteltével 1000 µg/ml-es, míg 48 órát követően az 500 és 1000 µg/ml-es töménységű TAF is. Az eredményeket a kontroll csoporthoz (0 µg/ml) viszonyítottuk és annak százalékában fejeztük ki.



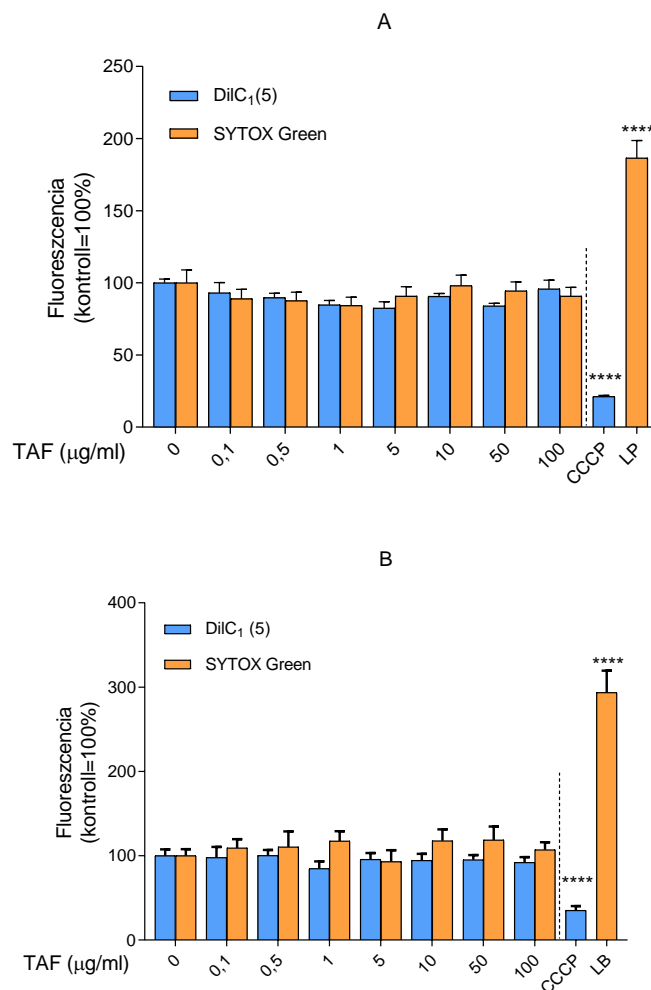
25. ábra A TAF endothel sejtek életképességére gyakorolt hatása 24 (A) és 48 (B) órás kezeléseket követően (MTT-assay).

Az életképesség (abszorbancia) értékeket átlag±SEM alakban a kontroll átlagához (=100%) viszonyítva ábrázoltuk.

****: $p < 0,0001$ **TAF**: Tisztított antocianin frakció

Figyelembe véve, hogy a TAF magasabb koncentrációi (500 és 1000 µg/ml) citotoxikus hatást fejtenek ki, felvetődhet, vajon az alacsonyabb koncentrációk is elindítanak-e olyan negatív celluláris folyamatokat, amelyek detektálása MTT-assay alkalmazásával nem megvalósítható. Annak érdekében, hogy kizárjuk a korai apoptotikus és nekrotikus események lehetőségét kombinált DiIC₁(5)-SYTOX Green fluoreszcens

jelölést alkalmaztunk. A kísérletek során megállapítottuk, hogy a TAF 1-100 µg/ml koncentrációtartományban nem befolyásolja szignifikánsan az apoptotikus és nekrotikus sejtek arányát 24 és 48 óra elteltével (26. ábra). Ezek az eredmények összhangban állnak az MTT-assay során tapasztaltakkal. A további kísérletek szempontjából nem releváns, de érdekes mellékszál, hogy a TAF magasabb koncentrációi (>100 µg/ml) által okozott citotoxikus hatás következtében apoptózis következik be. Az eredményeket a kontrollhoz (0 µg/ml) viszonyítottuk és annak százalékában fejeztük ki.



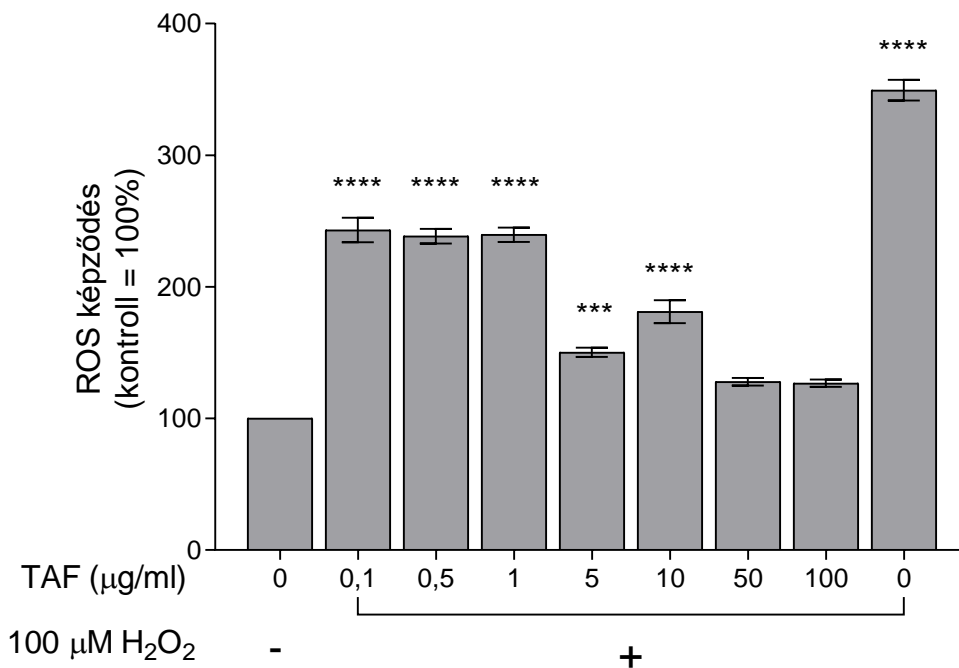
26. ábra A TAF endothel sejtek korai sejthalálfolyamataira gyakorolt hatása 24 (A) és 48 (B) órás kezeléseket követően (DiIC₁(5) és SYTOX Green assay).

A fluoreszcencia értékeket átlag±SEM alakban a kontroll átlagához (=100%) viszonyítva ábrázoltuk. ****: p <0,0001

CCCP: Karbonil cianid m-klórfenilhidrazon, **LB:** Lízis puffer, **TAF:** Tisztított antocianin frakció

5.3.1.2. 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 – ahogyan az 27. ábra oszlopdiagrammja mutatja – a 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 termelés jelentős részének – majd egészének – eliminálására, a további kutatásainkhoz ezt a koncentrációt használtuk.



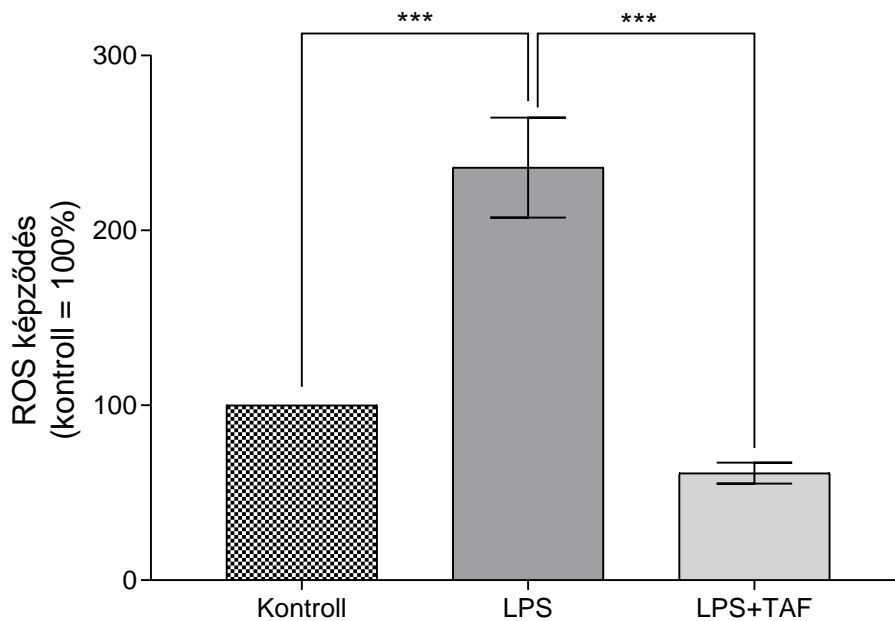
27. ábra A TAF antioxidáns kapacitásának értékelése endothel sejtenyészetben.

A fluoreszcencia értékeket $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ alakban a kontroll átlagához (=100%) viszonyítva ábrázoltuk

: $p < 0,0005$, *: $p < 0,0001$ **H₂O₂**: Hidrogén-peroxid, **TAF**: Tisztított antocianin frakció

5.3.2. A TAF hatása az LPS által előidézett oxidatív stresszre

Az endothel diszfunkció kialakulásához számos mechanizmus járul hozzá, amelyek együttesen, egymást erősítve a kórkép progresszióját eredményezhetik. Ilyen, önmagában is összetett eseménysor a gyulladás, amely talán a leggyakoribb endothel diszfunkciót eredményező kórélettani állapot. A TAF optimális koncentrációjának meghatározását követően annak LPS által indukált inflammatorikus folyamatokra való biológiai hatásait vizsgáltuk. A szervezetben lejátszódó gyulladásos folyamatok fokozzák a szabad gyökök termelődését, ami a redox egyensúly felborulásához, végeredményben pedig az érintett sejtek szövetek további, akár irreverzibilis károsodásához vezethet. Tekintettel az oxidatív stressz gyulladásban betöltött alapvető szerepére elsőként a sejtek oxidatív állapotát értékeltük. Vizsgáltuk a ROS termelődésének változását az LPS kezelés hatására, valamint azt, hogy a TAF képes-e befolyásolni ezt a változást gyulladásos modellünkben 24 órás mintavételek esetén. Az LPS több mint kétszeres ROS produkciót eredményezett tenyészetünkben a kontrollhoz viszonyítva, míg a TAF képes volt eliminálni az LPS által okozott fokozott ROS termelődést (28. ábra).



28. ábra A TAF hatása LPS kezelést követő ROS képződésre endothel sejtenyészetben.

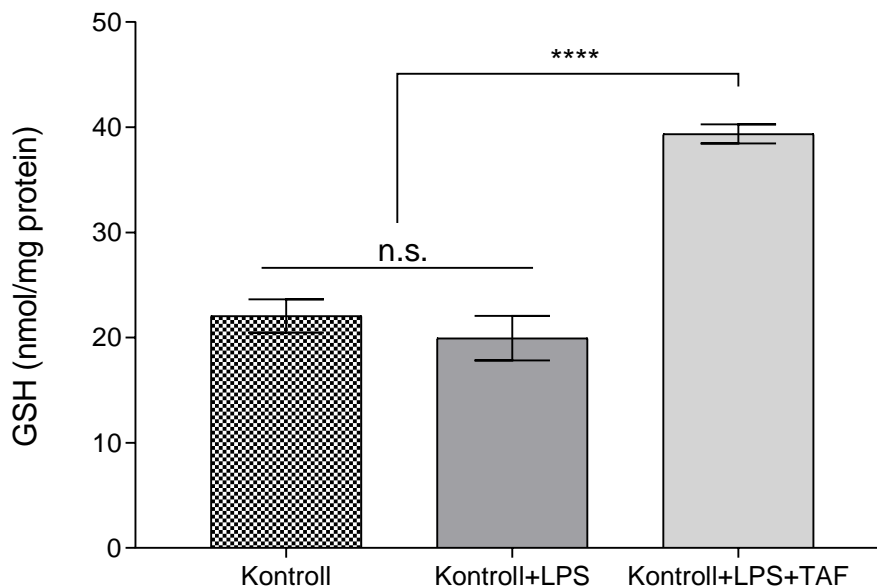
A fluoreszcencia értékeket átlag±SEM alakban a kontroll átlagához (=100%) viszonyítva ábrázoltuk.

***: $p < 0,005$

LPS: Lipopoliszacharid, **TAF:** Tisztított antocianin frakció

Az élő rendszerek oxidatív állapotának jellemzésére általánosan használt módszer a glutation (GSH) szintjének vizsgálata (Gyurászová et al., 2018). Kísérleteinkben 24 órás kezelést követően kvantifikáltuk a GSH intracelluláris szintjeit. Az LPS kezelés hatására ugyan nem detektáltunk statisztikailag szignifikáns változást a GSH szintjében, de biológiai szempontból releváns lehet az a csökkenés, ami a 29. ábrán látható. Függetlenül ettől a TAF látványosan emelte a GSH szintjét, az antioxidáns kapacitás erősítését eredményezve.

A HUVEC redox egyensúlyát érintő kísérleteink megerősítik, hogy a TAF képes enyhíteni az oxidatív stresszt a ROS direkt eliminációjával, valamint fokozza a sejtek antioxidáns kapacitását a glutation szintjének növelésével.



29. ábra LPS kezelést követő glutation koncentráció változás TAF hatására endothel sejtenyészetben.

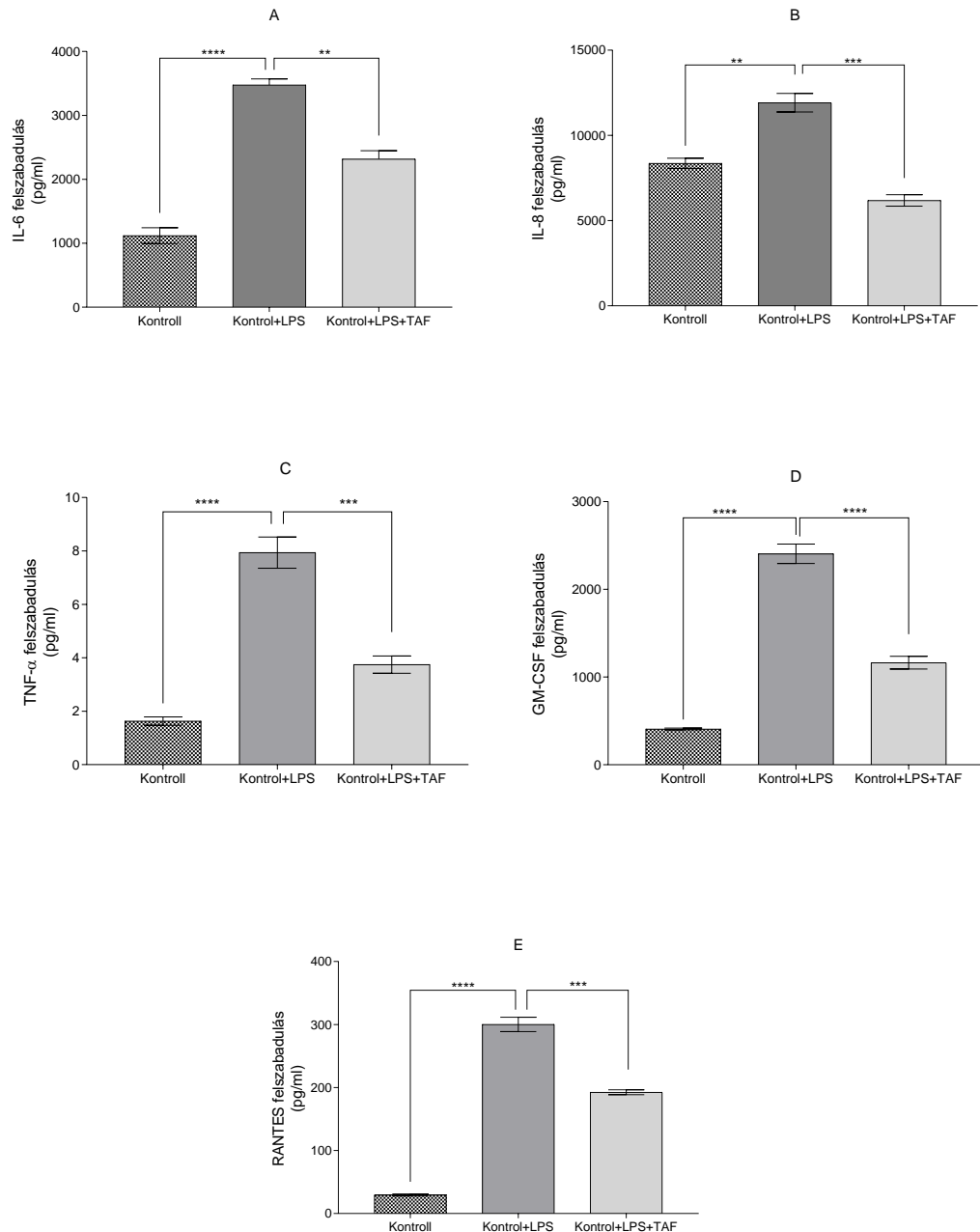
****: $p < 0,0001$

LPS: Lipopoliszacharid, **TAF:** Tisztított antocianin frakció

5.3.3. 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 és granulocita makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF) HUVEC modellben termelődött mennyiségeinek vizsgálatával az endotheliumot érintő inflammatorikus folyamatokról kívántunk átfogó képet alkotni. A szekretált citokinek koncentrációját 24 órás kezeléseket követően a sejtek felülszójából határoztuk meg. A TAF szignifikánsan csökkentette az LPS kezelést követő fokozott citokin felszabadulást (30. ábra).

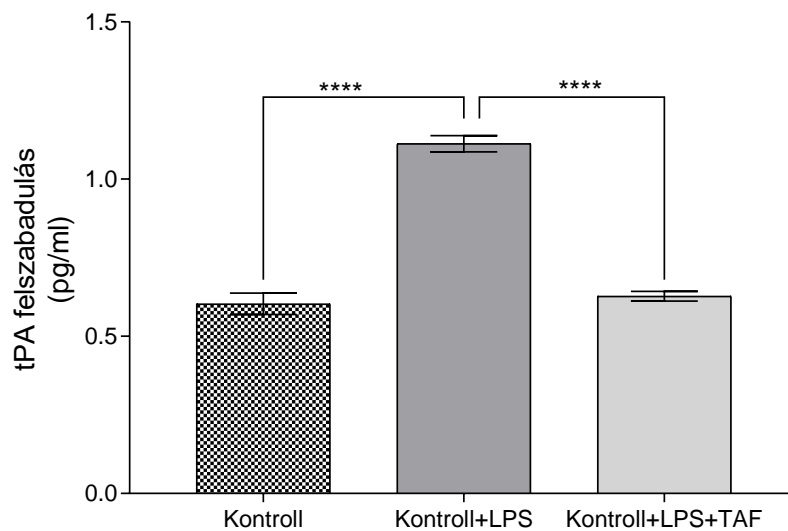


30. ábra A TAF hatása LPS kezelést követő proinflammatorikus fehérjék képződésére (IL-6 (A), IL-8 (B), a TNF- α (C), a GM-CSF (D) és a RANTES (E)) endothel sejtenyészetben.

** $: p < 0,01$; *** $: p < 0,005$; **** $: p < 0,0001$

GM-CSF: Granulocita makrofág kolónia-stimuláló faktor, **IL-6**: Interleukin-6, **IL-8**: Interleukin-8, **LPS**: Lipopoliszacharid, **RANTES**: Aktiváció hatására szabályozott, normál T-sejt-expresszált és szekretált, **TNF- α** : Tumor nekrozis faktor alfa, **TAF**: Tisztított antocianin frakció

Az endothelium központi helyzeténél fogva számos funkciót lát el az emberi szervezetben. Az endothel sejtekben a TAF LPS által indukált inflammációra való hatásának tanulmányozásánál – egyfajta holisztikus megközelítéssel – arra törekedtünk, hogy vizsgálataink minél szélesebb skálán jellemezzék a kiváltott összetett folyamatot. A következő kísérletekben ezért tPA fehérje szinten történő expresszióját határoztuk meg. A tPA kettős funkcióval rendelkezik, szerin proteázként kulcsszerepet játszik a hemosztázis szabályozásában, citokinként pedig a membránreceptoraihoz kötődve intracelluláris jelátviteli folyamatokat is modulál (Hu et al., 2006). Az LPS kezelés hatására a tPA szintje szignifikánsan megemelkedett, amit a TAF effektíven gátolt 24 órás kezeléseket követően (31. ábra).



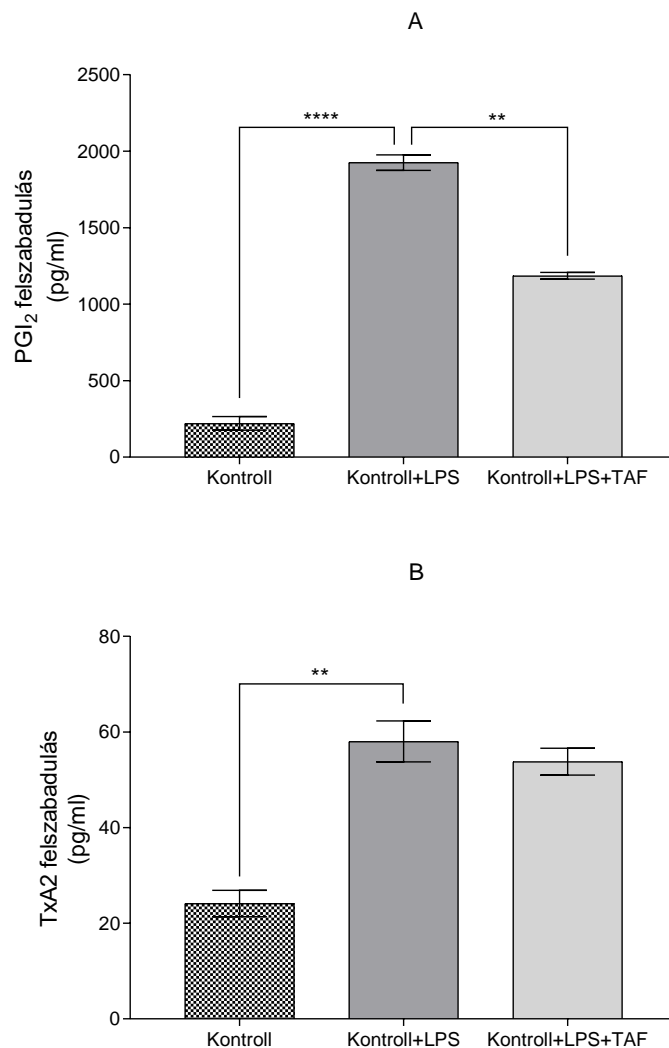
31. ábra TAF hatása LPS kezelést követő tPA szekrécióra endothel sejtenyészetben.

****: $p < 0,0001$

LPS: Lipopoliszacharid, **TAF:** Tisztított antocianin frakció **tPA:** szöveti plazminogén aktivátor

5.3.4. A TAF hatása az eikozanoidok szintézisére

A gyulladás szabályozásában alapvető fontosságú fehérje származékok – citokinek, kemokinek – mellett a gyulladás lokális szabályozásában fontos szerepet töltenek be az AA származékai, az eikozanoidok is (Imig, 2020). Gyulladásos modellünkben megvizsgáltuk a TxA_2 , valamint a PGI_2 szintjeit. Amint az 32. ábrán látható a TAF jelentősen befolyásolta a PGI_2 szintjét, míg a TxA_2 szekréciója nem változott meg szignifikáns mértékben.

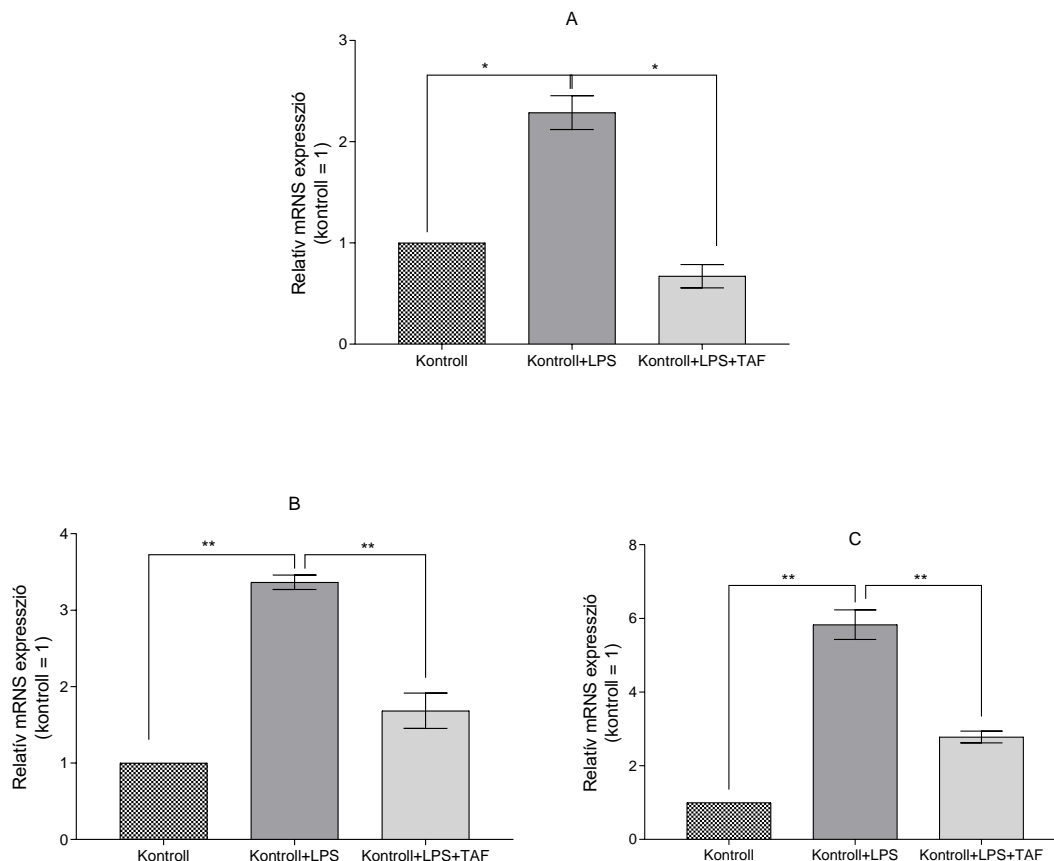


32. ábra TAF hatása LPS kezelést követő eikozanoid (PGI₂ (A) és a TxA₂ (B)) szintézisre endothel sejtenyészeten.

** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$

TAF: Tisztított antocianin frakció, **LPS:** Lipopoliszacharid **PGI₂:** Prosztagaciklin, **TxA₂:** Tromboxán

A PGI₂ koncentráció emelkedésének gátlása a gyakorlatban többféleképpen is megvalósulhat (szintetizáló enzimek transzkripciójának csökkenése, poszttranszlációs modifikálása, direkt gátlása stb). Méréseink szerint a szintetizáló enzimek (a COX-1, a COX-2 és a PGI₂ szintáz) génjeinek expressziója változik (33. ábra) Ez mind LPS (nő) mind TAF (csökken) hatására a vizsgált specifikus mRNS alapján transzkripció szinten érvényesül.



33. ábra TAF hatása a PGI₂ szintáz (A) a COX-1 (B) és a COX-2 (C) expressziójára LPS kezelést követően endothel sejtenyészetben.

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

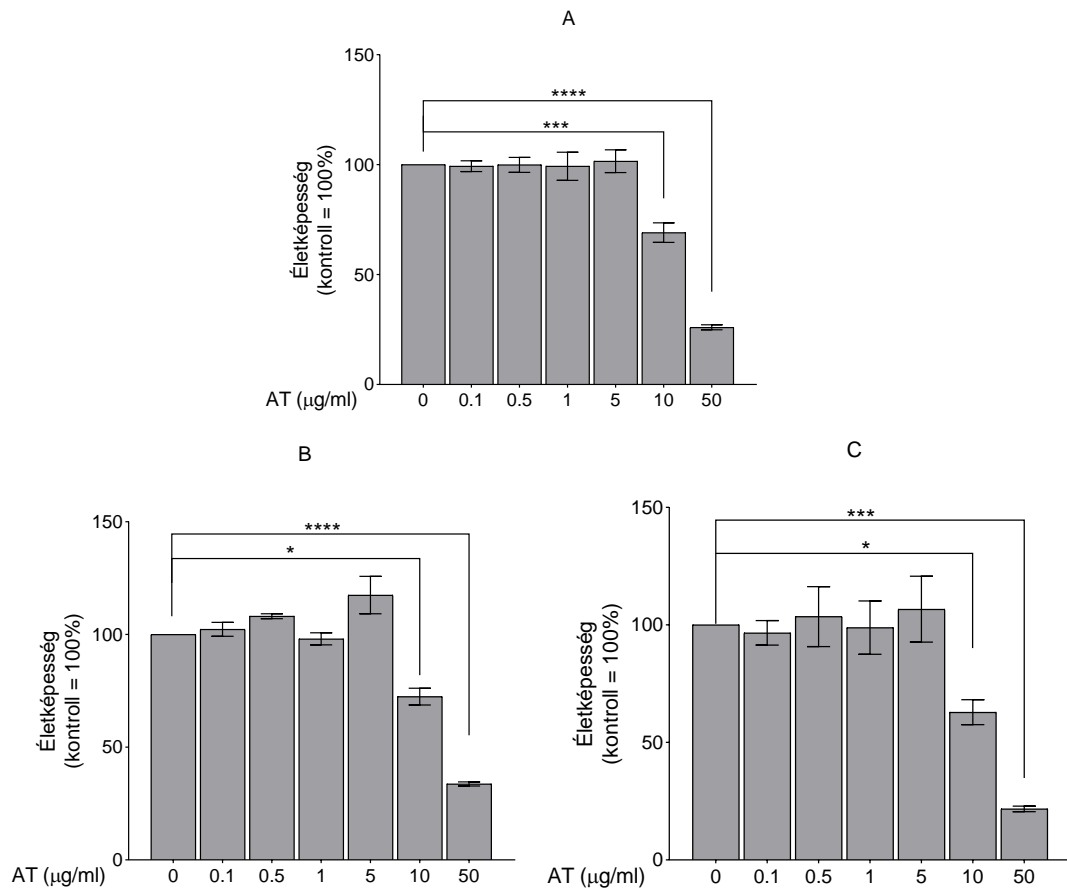
COX-1: Ciklooxygenáz-1, **COX-2:** Ciklooxygenáz-2, **PGI₂ szintáz:** Prosztaciklin szintáz, **LPS:** Lipopoliszacharid, **TAF:** Tisztított antocianin frakció

5.4. Az allitiamin hatása a hiperglikémia által kiváltott endotheliális diszfunkcióra

5.4.1. Az allitiamin optimális koncentrációjának meghatározása

Az allitiamin hiperglikémiára gyakorolt hatását szintén HUVEC modellben vizsgáltuk. Ahogyan a TAF-val végzett kísérletek során, az allitiamin esetében is először a sejtek életképességére gyakorolt hatását értékeltük MTT-assay alkalmazásával. A HUVEC-et különböző koncentrációjú allitiaminnal (0,1-50 $\mu\text{g/ml}$) kezeltük 24, 48 és – tekintettel a további kísérletek során megvalósuló hosszabb távú, egy hetes inkubációkra – 72 órán keresztül monitoroztuk a sejteket. A 34. ábra alapján a legmagasabb allitiamin

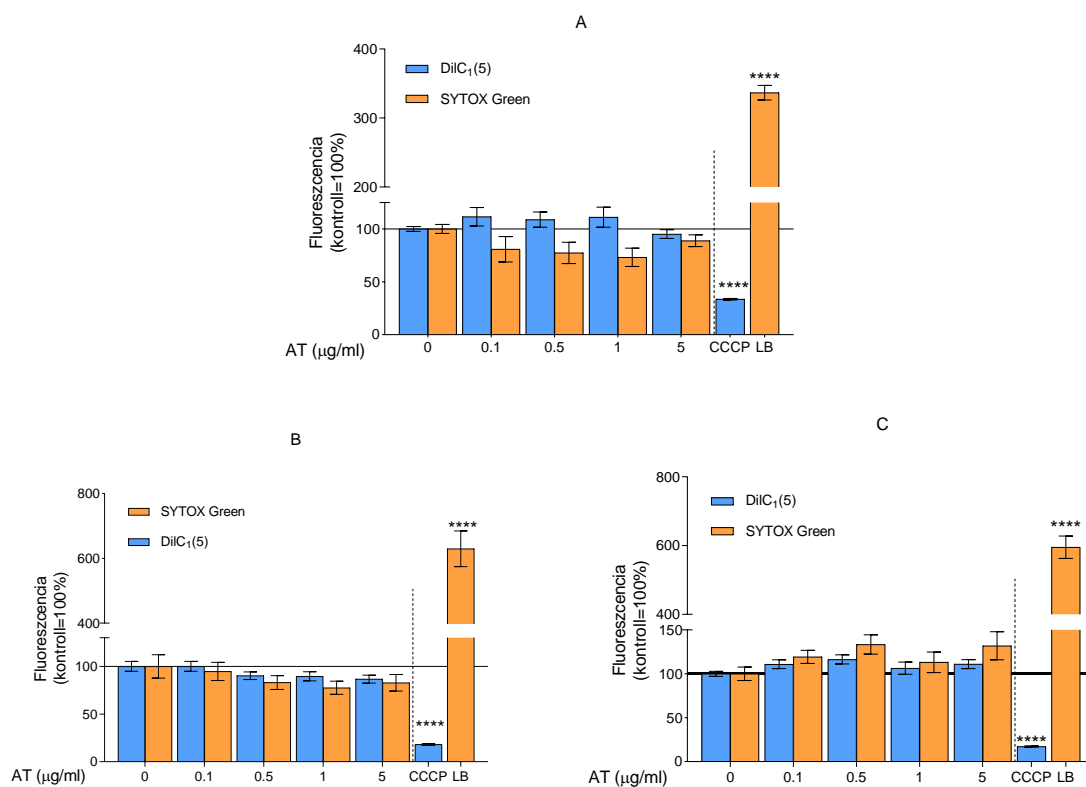
koncentráció, ami még nem csökkentette a sejtek viabilitását, az 5 µg/ml volt mindegyik mintavételi időpontban.



34. ábra Az allitiamin endothel sejtek életképességére gyakorolt hatása 24 (A), 48 (B) és 72 (C) órás kezeléseket követően (MTT-assay).

Az életképesség (abszorbancia) értékeket átlag±SEM alakban a kontroll átlagához (=100%) viszonyítva ábrázoltuk. *: $p < 0,05$; ****: $p < 0,0001$ **AT**: Allitiamin

Annak érdekében, hogy kizárjuk a korai apoptotikus és nekrotikus események lehetőségét további vizsgálatokat végeztünk. Az allitiaminnal való kezelést követően fluoreszcens festékeket (DiI_{C1}(5) és SYTOX Green) alkalmaztunk, hogy szenzitívebbé tegyük az MTT-assay eredményeit. A 35. ábrán látható adatok azt mutatják, hogy az allitiamin 0,1-5 µg/ml koncentrációtartományban nem indukált sem apoptotikus, sem nekrotikus folyamatokat. Ezek alapján az allitiamin biológiai szempontból releváns citotoxikus hatások kockázata nélkül alkalmazható a ≤5 µg/ml koncentrációiban. A további kísérletek során 5 µg/ml-es töménységű allitiamint alkalmaztunk.



35. ábra Az allitiamin endothel sejtek korai sejthalálfolymataira gyakorolt hatása 24 (A), 48 (B) és 72 (C) órás kezeléseket követően (DiIC₁(5) és SYTOX Green assay).

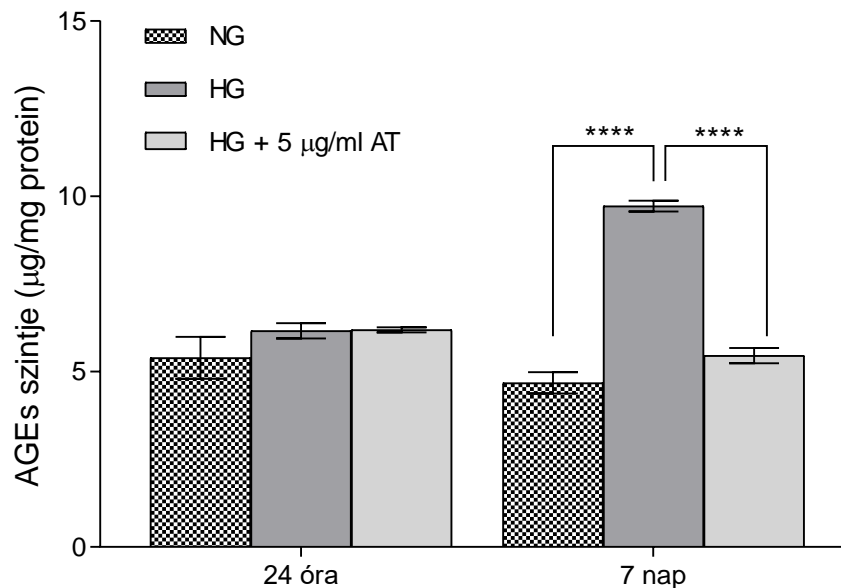
Az fluoreszcencia értékeket átlag±SEM alakban a kontroll átlagához (=100%) viszonyítva ábrázoltuk.

****: $p < 0,0001$ AT: Allitiamin, CCCP: Karbonil cianid m-klorofenilhidrazon, LB: Lízis puffer

5.4.2. Az allitiamin hatása az AGEs képződésére

Kísérleteinkben az endothel sejteket tartósan magas – de diabetesben előforduló – glükóz koncentrációnak (30 mmol/l) kiteve modelleztük a krónikus hiperglikémiát. A perzisztens hiperglikémia az élő sejtekben az AGEs-k fokozott kialakulását idézi elő, különös tekintettel azokra a sejtekre, amelyek inzulintól független módon képesek felvenni a glükózt. A fohagyma egyes kénvegyületeinek tulajdonított jótékony antihyperglykémias hatás részben az AGEs-képződés csökkentésével függ össze (Ahmad et al., 2007) Az allitiamin hatóanyagra vonatkozó vizsgálatokat ezért az AGEs szintek értékelésével kezdtük egynapos és egyhetes magas cukor koncentrációnak való

kitettséget követően. Egy hetes inkubációt követően 30 mmol/l glükóz megemelte az AGEs szintjét az endothel sejtekben (36. ábra). 24 óra után nem találtunk szignifikáns változást. A hiperglikémia által kiváltott majdnem kétszeres növekedést az allitiamin fentiekben meghatározott, nem citotoxikus koncentrációja (5 $\mu\text{g/ml}$) szignifikáns mértékben képes volt gátolni.



36. ábra Az allitiamin hatása az AGEs szintjére endothel sejtenyészetben 24 órás és egy hetes inkubációt követően.

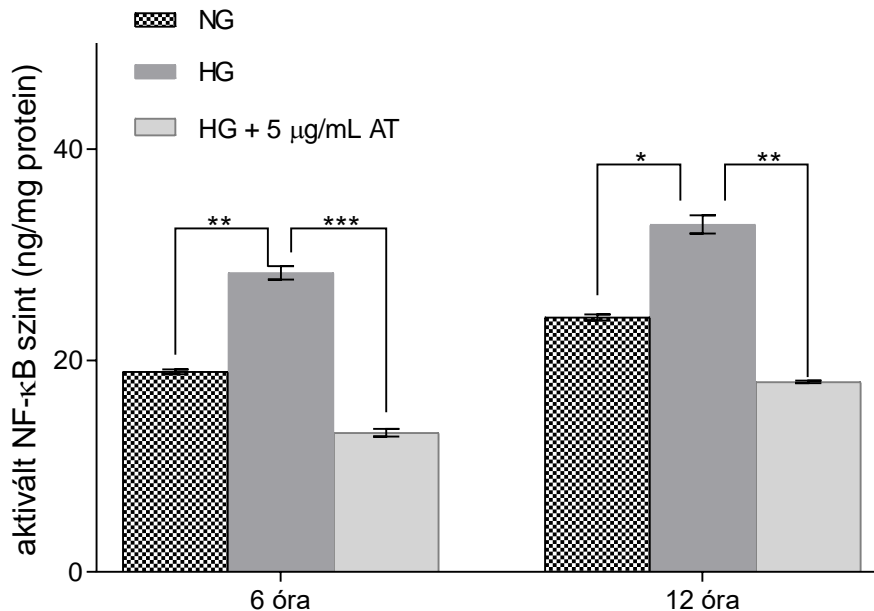
****: $P < 0,0001$

AGEs: Késői glikációs végtermékek, **AT:** Allitiamin, **HG:** Hiperglikémia (30 mmol/l glükóz), **NG:** Normoglikémia (5 mmol/l glükóz)

5.4.3. Az allitiamin hatása a hiperglikémia okozta inflammatorikus folyamatokra

Annak érdekében, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a hiperglikémia okozta celluláris eseményekbe, olyan markerfehérjéket kerestünk, amelyek expressziós szintjében rövidtávon is változás következik be hiperglikémiás környezetben. Számos tanulmány közölte a hiperglikémia és az endothelium gyulladáshoz vezető szoros kapcsolatot (Funk et al., 2012; Hoffman, 2015). Ennél fogva a hiperglikémia során aktiválódó gyulladáshoz vezető folyamatokban fontos szerepet játszó NF- κ B transzkripciós faktor aktivációját értékeltük 6 és 12 óra órás hiperglikémiás inkubáció elteltével HUVEC

sejtlizátumában. Megállapítottuk, hogy a hiperglikémiás állapot már korai szakaszban aktiválta az NF- κ B-t, amit az allitiamin képes volt szignifikánsan csökkenteni (37. ábra).

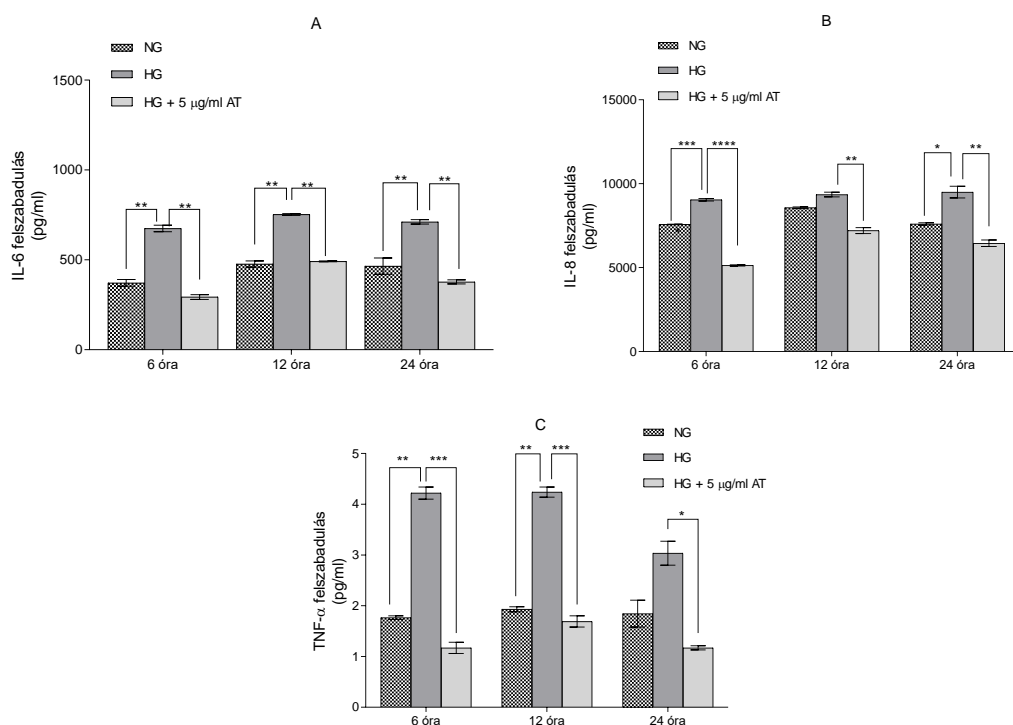


37. ábra Az allitiamin hatása az NF- κ B aktivációra endothel sejtenyészetben 6 és 12 órás inkubációt követően.

*: P < 0,05; **: P < 0,005; ***: P < 0,0005

AT: Allitiamin, **HG:** Hiperglikémia (30 mmol/l glükóz), **NG:** Normoglikémia (5 mmol/l glükóz)

Az NF- κ B-re vonatkozó kísérletek után kíváncsiak voltunk, hogy bizonyos immunológiailag aktív molekulák szekréciója hogyan változik a hiperglikémiás környezet és az allitiaminnal való kezelés hatására. Ezért kísérleteink következő lépésében a TNF- α , IL-6 és IL-8 citokinek felszabadulását Luminex/MagPlex módszerrel mértük a sejtek felülszójából 6, 12, 24 órás inkubálást követően (38. ábra). Míg az IL-6 szekréciója az összes mintavételi idő alatt szignifikánsan megnövekedett a 30 mmol/l-es glükóz 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. Ez alapján allitiamin pozitívan befolyásolhatja a hiperglikémia által kiváltott gyulladási választ.



38. ábra Az allitiamin hatása az IL-6 (A), az IL-8 (B), és a TNF- α (C) proinflammatorikus citokinek szekréción szintjére 6, 12 és 24 órás inkubációt követően.

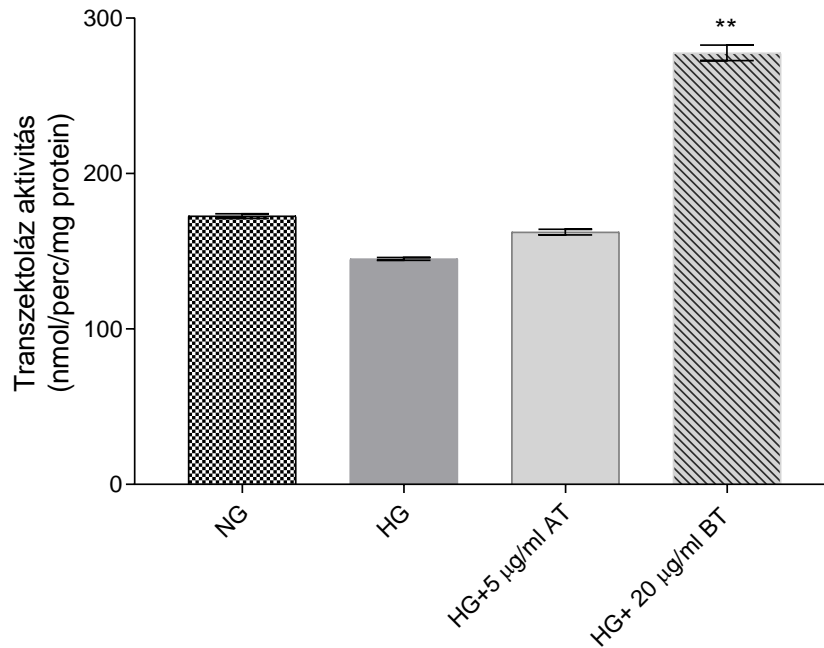
*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$; ****: $p < 0,0001$

AT: Allitiamin, **HG:** Hiperглиkémia (30 mmol/l glükóz), **NG:** Normoglikémia (5 mmol/l glükóz), **IL-6:** Interleukin-6, **IL-8:** Interleukin-8, **TNF- α :** Tumor nekrozis faktor alfa

5.4.4. Az allitiamin pozitív biológiai hatásának feltételezett eredete

5.4.4.1. 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. Pozitív kontrollként benfotiamint alkalmaztunk a kísérletek során. A 39. ábrán látható a transzketoláz enzim aktivitás méréseiből származó eredmények. Ez alapján az allitiamin nem befolyásolta szignifikánsan, míg a benfotiamin majdnem kétszeresére növelte az enzim aktivitást. Az eredmények értelmében az allitiamin pozitív hatásai függetlenek a transzketoláz enzim aktivációjától.



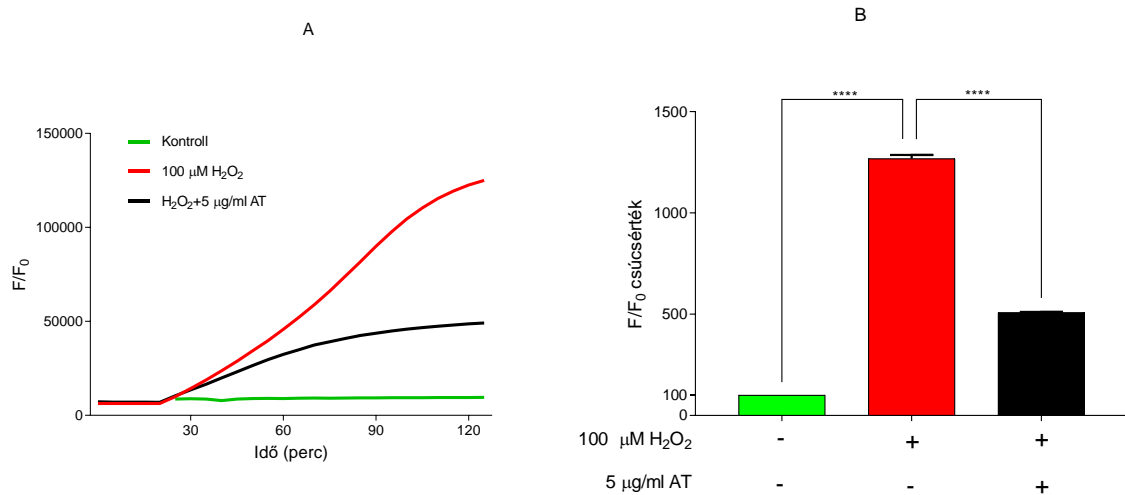
39. ábra Az allitiamin és a benfotiamin hatása az transzketoláz enzim aktivitására 6 órás inkubációt követően.

** $: p < 0,01$

AT: Allitiamin, **BT:** Benfotiamin, **HG:** Hiperglikémia (30 mmol/l glükóz), **NG:** Normoglikémia (5 mmol/l glükóz)

5.4.4.2. Az allitiamin erős antioxidáns kapacitással rendelkezik

Tekintettel a transzketoláz aktivitásra vonatkozó, nullhipotézisünket nem támogató eredményekre, az allitiamin általunk igazolt biológiai hatása mögött más mechanizmusokat kerestünk. A benfotiamin esetében leírtak a transzketoláz aktivitás fokozásától 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 molekuláris szerkezettel rendelkeznek (ajoene, S-allil cisztein stb.) (Jang et al., 2017; Kay et al., 2010; Lu et al., 2017). Figyelembe véve ezeket az információkat, megvizsgáltuk az allitiamin ROS elimináló képességét. A 40. ábrán látható, hogy az allitiamin a H_2O_2 okozta fokozott ROS-termelést szignifikáns mértékben képes volt csökkenteni, ami az allitiamin erős antioxidáns tulajdonságát igazolja.



40. ábra Az allitiamin antioxidáns hatása.

A fluoreszcens intenzitást az alapvonalra normalizáltuk (A). A statisztikai elemzést a csúcs fluoreszcencia értékek segítségével (F/F_0) végeztük (B). Az fluoreszcencia értékeket $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ alakban a kontroll átlagához (=100%) viszonyítva ábrázoltuk.

****: $p < 0,0001$

AT: Allitiamin, **H₂O₂:** Hidrogén-peroxid

6. Következtetések, javaslatok

A hatóanyagok gyulladás és hiperglikémia okozta endothel diszfunkcióra gyakorolt biológiai hatásának *in vitro* vizsgálatát HUVEC sejt kultúrán végeztük.

Tisztított antocianin frakcióval kapcsolatos kísérletek

A TAF inflammatórikus folyamatokra való hatását annak optimális koncentrációjának a meghatározásával kezdtük (25., 26., 27. ábra) amely alapján az 50 µg/ml-es koncentrációt választottuk a további kísérleteinkhez.

Az antocianinok magas antioxidáns kapacitással rendelkező vegyületek (Kähkönen and Heinonen, 2003). Egyfelől protondonorként közvetlenül képesek semlegesíteni a reaktív gyököket (Reis et al., 2016), másrészt indirekt módon fokozzák az Nrf2 aktiválódásán keresztül a γ -glutamil-cisztein-szintáz expresszióját, ami meghatározó a potens antioxidáns hatású glutation szintézisében (Salehi et al., 2020). A TAF hatását vizsgálva a ROS képződésre (28. ábra) és a GSH szintjének (29. ábra) változására LPS-sel kezelt endothel sejtenyészetben azt tapasztaltuk, hogy a TAF helyreállítja a pro- és antioxidánsok egyensúlyát, enyhítve ezáltal az oxidatív stresszt.

A gyulladás és az oxidatív stressz közti kapcsolódás intenzív kutatás tárgya napjainkban is (Steven et al., 2019). Az IL-6-nak és IL-8-nak központi szerepe van az immunreakciókban, a B-limfocitákra, a T-limfocitákra, makrofágokra, granulocitákra gyakorolt hatásuk miatt (Qazi et al., 2011; Tanaka et al., 2014). A TNF- α -t az akut gyulladás során – elsősorban – a makrofágok és a monociták termelik és egy sor, az inflammáció során bekövetkező szignáltranszdukciós folyamatért felelős (Idriss and Naismith, 2000). Az endotheliális sejtek olyan kemokinek is termelnek, amelyek szabályozzák az eozinofil kemotaxist. Ezen ágensek egyike a RANTES (Appay and Rowland-Jones, 2001). Egy másik kemokin, a GM-CSF fontos hematopoietikus növekedési faktor és immunmodulátor fehérje. A GM-CSF-nek fontos szerepe van a leukociták funkcionális aktivitásában is (Shi et al., 2006). A TAF az LPS-sel kezelt HUVEC-ben ezen faktorok szekrécióját csökkentette (30. ábra), ami arra utal, hogy képes modulálni a gyulladásos választ akut gyulladás esetén HUVEC-ben. Eredményeink összhangban állnak azokkal a kutatásokkal, melyek az antocianinok antioxidáns kapacitását (Heo and Lee, 2005; Wu et al., 2018) és antiinflammatórikus hatását hangsúlyozzák (Huang et al., 2018; Karlsen et al., 2007)

Kísérleteink során a citokinként és hemosztázis modulátoraként is funkcionáló tPA (Hu et al., 2006) szekréciós szintjeit is megvizsgáltuk. Megfigyeléseink alapján a TAF

csökkenti a tPA szintjét alkalmazott sejtmodellünkben (31. ábra) A TAF a tPA moduláló hatása révén kétélű kardként eszköze lehet a gyulladás enyhítésének.

Az arachidonsav-származékok kulcsfontosságú szerepet játszanak a gyulladás helyi szabályozásában (Imig, 2020). Megállapítottuk, hogy az TAF jelentős hatással van a PGI₂ bioszintézisére, a TxA₂ szekréciót azonban nem befolyásolta szignifikánsan (32. ábra). A hatásmechanizmus pontosabb leírása érdekében megvizsgáltuk a COX-1, COX-2 és PGI₂ szintáz enzimek expressziós szintjeit (33. ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy a TAF eikozanoid metabolizmusra gyakorolt hatását a PGI₂ szintézisében résztvevő enzimek expressziójának befolyásolásával fejtik ki.

Tekintettel arra, hogy az endothelium fontos szerepet játszik a gyulladás közvetítésében, a vérzéscsillapítás folyamatában, a vazodilatáció és a vazokonstriktio egyensúlyának fenntartásában, a keringő vér és az interstícium közötti anyagcserében, valamint figyelembe véve, hogy a TAF ezen folyamatok szabályozásában résztvevő több fontos molekula szintézisét befolyásolni képes elmondható, hogy a TAF pleiotróp módon képes lehet enyhíteni a gyulladásos folyamatokat.

Allitiaminnal kapcsolatos kísérletek

Az allitiamin kémiai úton szintetizáltuk, ugyanis a szükséges mennyiségű preparációja kutatási célból, nem ipari körülmények között kevésbé kivitelezhető. A szintetizált allitiamint HPLC-vel tisztítottuk (18. ábra) majd MALDI-TOF MS (19. ábra) és NMR (20. ábra) segítségével szerkezetigazoló vizsgálatokat végeztünk.

Ezen dolgozat célkitűzése mindenekelőtt az irodalmi áttekintésben részletesen ismertetett biológiailag aktív komponensek potenciális élettani hatásának vizsgálata. Az allitiaminnal kapcsolatos kutatásaink során azonban nem csak fiziológiai hanem analitikai vizsgálatokat is végeztünk. Ezek eredményeit továbbgondolva meglepő perspektíva tárulhat fel, ezért bemutatásukat indokoltnak véljük, továbbá úgy gondoljuk, hogy ezen dolgozat kereteit – noha nem illeszkednek maradéktalanul *in vitro* vizsgálataink aspektusába – nem feszítik szét. Az előzőekben szintetizált, tisztított és szerkezetileg igazolt allitiamint az *in vitro* vizsgálatok mellett referenciaanyagként használtuk, hogy megvizsgáljuk az allitiamin paprikamagban való feltételezett jelenlétét.

Az allitiamint eddig, mint az *Allium* nemzetség tagjai által felhalmozott vegyületet írták le (Fujiwara et al., 1954). Igazolandó, hogy előfordulása gyakoribb az élővilágban, „kápia” paprika (*Capsicum annuum* L.) magjainak etanolos extraktumát vizsgáltuk. HPLC (21. ábra) és HPLC-MS analízisek (22. ábra) egyértelműen bizonyították, hogy az allitiamin akkumulálódik a paprikamagban.

A paprikamagban kimutatható allitiamin vegyület más növényekben, növényi részekben is előfordulhat. Amennyiben feltételezésünk igazolódik, felvetődik a kérdés, miért szintetizálják a növények az allitiamint. Az allitiamin mind az *Allium* nemzetségben, mind a paprikában a szaporításban szerepet játszó növényi részhez asszociáltan tárolódik. A csírázás során olyan metabolikus útvonalak aktiválódnak (nukleinsav, zsírsav bioszintézis, energiatermelés), amelyben – ahogy arról az irodalmi áttekintésben szó esett – a TPP-nek jelentős szerepe van (Gołda et al., 2004). A tiamin apolárosabb formája, az allitiamin a sejtmembránok számára könnyebben átjárható, ami előnyt jelenthet a növények számára ezekben az energiaigényes biokémiai folyamatokban. Kétségtelen, hogy feltételezésünk igazolása komplex – genomikai, metabolomikai – vizsgálatokat követel, illetve további növényélettani kutatásokat alapozhat meg. Eredményeink alapján érdemes megfontolni más növények ezirányú vizsgálatát.

Allitiaminnal kapcsolatos kísérleteink másik részében az eddig élettani hatását illetően kevésbé kutatott allitiamint hiperglikémiás körülmények között vizsgáltuk HUVEC-en.

Számos tanulmány demonstrálta, hogy a tiamin és szintetikus analógja, a benfotiamin csökkenti a DM okozta mikrovaskuláris szövődmények progresszióját (Balakumar et al., 2010; Volvert et al., 2008). Azt is leírták, hogy a fokhagyma kén tartalmú vegyületei (ajoén, alliin, allicin, diallil-diszulfid S-allil-cisztein stb.) antihiperglikémiás hatással rendelkeznek (Eidi et al., 2006). Az allitiamin tiaminnal való szoros szerkezeti hasonlósága miatt és mert az említett organoszulfur vegyületek allil diszulfid molekularészét magában foglalja, feltételeztük, hogy képes antihiperglikémiás hatások közvetítésére.

Az allitiamin nem citotoxikus koncentrációját – ahogyan a TAF esetében is – életképességi vizsgálatokkal határoztuk meg, amely során megállapítottuk, hogy az allitiamin 5 µg/ml koncentrációig nem befolyásolja szignifikánsan az endothel sejtek viabilitását (34., 35. ábra).

A perzisztens hiperglikémia során alternatív glükózbontó metabolikus útvonalak aktiválódnak, amiken keresztül a hiperglikémia káros hatásait közvetítő intermedierek képződnek (Brownlee, 2005). A hosszantartó hiperglikémia jellemzésére rutinszerűen használt módszer egy specifikus AGEs (hemoglobin A1c) kvantifikálása (Leslie and Cohen, 2009). Mind a benfotiamin (Stirban et al., 2006), mind a fokhagyma kénvegyületei (Ahmad et al., 2007) esetében leírták, hogy csökkentik az AGEs

hiperglikémia okozta fokozott képződését *in vitro* és *in vivo*. Ebből kifolyólag megvizsgáltuk az allitiamin AGEs szintre gyakorolt hatását hiperglikémia HUVEC modelljében. Megállapítottuk, hogy az allitiamin szignifikáns mértékben csökkenti az AGEs szintjét sejtenyészetünkben hosszantartó (1 hét) hiperglikémia során (36. ábra)

Az NF- κ B szerepe kulcsfontosságú a hiperglikémia következtében kialakuló gyulladásos folyamatokban, upregulációját fokozott citokin szekréció követi (Kang et al., 2019). Az allitiamin rövid távú hatásának vizsgálatához értékeltük az NF- κ B aktivációját 6 és 12 órás kezeléseket követően (37. ábra), valamint a HUVEC gyulladásos állapotát jól tükröző IL-6, IL-8 és TNF- α citokinek szekréció változásait kvantifikáltuk (38. ábra) Azért, hogy a HUVEC kvázi azonnali citokin szekréciójáról (korai immunválaszáról; 6-12h) és a *de novo* citokin szintéziséről (késői fázisáról; 12-24 h) is információt szerezzünk 6, 12 és 24 órás mintavételeket abszolváltunk. Megállapítottuk, hogy az allitiamin szignifikánsan csökkentette a hiperglikémia okozta fokozott NF- κ B aktivációt és az IL-6, IL-8 és TNF- α citokinek szekrécióját.

Azt feltételeztük, hogy az allitiamin rövid ideig (24h) és hosszan tartó (1 hét) hiperglikémiának kitett HUVEC-re gyakorolt pozitív hatása mögött egyaránt – hasonlóan a tiaminhoz és a benfotiaminhoz – a transzketoláz aktivitásának fokozása áll. Megvizsgáltuk az allitiamin transzketoláz aktivitásra gyakorolt hatását, azonban azt találtuk, hogy az 5 μ g/ml allitiamin nem befolyásolta szignifikánsan azt (39. ábra)

Számos kutatás demonstrálta, hogy a prop-2-én-1-il csoportot tartalmazó, széles körben kutatott fokhagymavegyületek képesek csillapítani az oxidatív károsodást (Louis et al., 2012) és H₂S-donorként jótékony gyulladáscsökkentő hatást fejtenek ki (Melino et al., 2019; Rios et al., 2015). Tekintettel arra, hogy az allitiamin tartalmazza a prop-2-én-1-il csoportot, felvetődött, hogy az allitiamin – hasonlóan a fokhagyma organoszulfur vegyületeihez – jelentős antioxidáns hatással rendelkezik. A feltételezett antioxidáns hatás igazolásához mértük az allitiamin ROS elimináló képességét HUVEC sejtkultúrában, oxidáló ágensként H₂O₂-ot használva (40. ábra) A kísérletek során az allitiamin képes volt szignifikánsan mérsékelni a H₂O₂ által indukált fokozott ROS képződést, ami egyértelműen az allitiamin erős antioxidáns hatását tükrözi, magyarázatként szolgálhat a hiperglikémia által kiváltott endotheliális diszfunkció javítására.

Az allitiamin biológiai aktivitását *in vitro* modellünkben vizsgálva arra a következtetésre jutottunk, hogy a vegyület előnyösen képes befolyásolni a hiperglikémia

okozta kóros biológiai folyamatokat HUVEC-ben. Kimutattuk, hogy csökkenti a hiperglikémia okozta fokozott AGEs-képződést, NF- κ B aktivációt, proinflammatorikus citokin szekréciót. Úgy tűnik ennek háttérében az allitiamin nem tiamin-helyettesítő kofaktor szerepe, hanem antioxidáns tulajdonsága áll. Feltételezzük, hogy ezért az allitiamin allil-diszulfid molekuláris része – ami a fokhagyma bizonyítottan antioxidáns organoszulfur vegyületeivel közös kémiai struktúra – a felelős. Figyelembe véve bizonyított biológiai aktivitását, megfontolandó további vizsgálatok tervezése, más élettani modelleken (más típusú sejtekben, *in vivo* stb.), de – tekintettel a tiamin fontos szerepére centrális metabolikus folyamatokban – akár más kórképekben is.

Az endothel sejt kultúrával végzett hatóanyagvizsgálataink eredményeit és azok interpretációját limitálja *in vitro* természetük. Hagyományos vizsgálati módszerek mellett a jövőben elérhetőbbé válik és célszerű kihasználni az információs technológia fejlődéséből kinövő új kutatási eszközöket (AI, Big Data) is.

7. Új tudományos eredmények

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 transzkretoláz enzim aktivációjához, hanem a vegyület antioxidáns hatásához köthetőek.

8. Gyakorlatban alkalmazható eredmények

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 ítéltető meg objektíven hatóanyagaink gyakorlati jelentősége.

Mindazonáltal vizsgálatainkban bizonyítottuk:

1. A TAF az endothelium gyulladási 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.

9. Összefoglalás

Vizsgálataiban két patogenetikai modell – gyulladás illetve hiperglikémia okozta endothel diszfunkció – viselkedéséről gyűjtöttem adatokat növényi eredetű vegyületek jelenlétében.

Közismert a fejlett országokban a metabolikus szindrómához köthető elváltozások (kóros hasi elhízás, magasvérnyomás-betegség, lipid- és szénhidrátanyagcsere zavarai), a következményes cukorbetegség, szív- és érrendszeri betegségek továbbá a daganatos és gyomor-bél rendszeri megbetegedések emelkedő incidenciája. Ezen kóros állapotok patogenezisének egy-egy momentumát (hiperglikémia, inflammáció) megragadva vizsgáltuk meggy és paprika biológiailag aktív vegyületeit HUVEC sejtenyészeten.

A kísérletek során az endothel sejteket humán köldökzsinór vénájából izoláltuk, amiket áramlási citométerrel fenotipizáltunk. A 'Debreceni bőtermő' fajtából izolált TAF antocianin összetételét HPLC segítségével határoztuk meg. LPS által kiváltott gyulladás HUVEC modelljén igazoltuk, hogy a TAF pleiotróp módon képes immunmoduláló hatás kifejtésére.

Az élettani hatását illetően eddig kevésbé kutatott allitiamint hiperglikémiás körülmények között vizsgáltuk HUVEC-en. Az allitiamin kémiai úton szintetizáltuk, ugyanis a szükséges mennyiségű preparációja kutatási célból, nem ipari körülmények között kevésbé kivitelezhető. A szintetizált allitiamint HPLC-vel tisztítottuk, majd MALDI-TOF MS és NMR segítségével szerkezetigazoló méréseket végeztünk. A szintetizált, tisztított és szerkezetileg igazolt allitiamin referenciaanyagot először arra használtuk, hogy megvizsgáljuk az allitiamin paprikamagban való jelenlétét. HPLC és HPLC-MS analízisek egyértelműen bizonyították az allitiamin jelenlétét „kápia” paprika magjában.

Allitiaminnal kapcsolatos kísérleteink másik részében vizsgáltuk annak hatását a hiperglikémia okozta változásokra. Összességében bizonyítottuk, hogy az allitiamin – anélkül, hogy befolyásolná a HUVEC életképességét – az NF- κ B aktiváció csökkentésével, a proinflammatorikus citokinek felszabadulásának és az AGEs képződésének gátlásával mérsékeli a hiperglikémia negatív következményeit. Ennek háttérében erős antioxidáns hatása és a transzketoláz aktivitással nem összefüggő mechanizmus állhat.

A pontosabb hatásmechanizmus és az esetleges klinikai alkalmazhatóság tekintetében további vizsgálatok szükségesek, mindazonáltal a TAF és az allitiamin terápiás

potenciállal bírhat olyan megbetegedések esetén, melyekben a gyulladás vagy hiperglikémia okozta endothel diszfunkció patogenetikai tényező.

10. Summary

During my studies, two pathogenetic models, endothelial dysfunction caused by inflammation and hyperglycaemia, were investigated in the presence of plant-derived compounds.

It is well known that in developed countries, the incidence of disorders associated with metabolic syndrome is constantly increasing. Focus on mechanisms of these pathological conditions (hyperglycaemia, inflammation), we examined the biologically active compounds of sour cherri and pepper in HUVEC cell culture.

Endothelial cells were isolated from human umbilical cord vein and identified with a flow cytometer. The anthocyanin composition of purified anthocyanin fraction (PAF) isolated from 'Debrecen bőtermő' variety was determined by HPLC. In the HUVEC model of LPS-induced inflammation, we demonstrated that the PAF can positively influence the biological processes of endothelial cells through its antioxidant, anti-inflammatory, haemostatic, and vasoactive effects.

Regarding its physiological effect, allithiamine, which has been little researched so far, was studied under hyperglycaemic conditions in HUVEC. Allithiamine was chemically synthesized, because its preparation for research purpose, in non-industrial conditions, preparation is less feasible. The synthesized allithiamine was purified by HPLC, and then verified with MALDI-TOF MS and NMR. The synthesized, purified, and structurally validated allithiamine was first used in analytical studies to investigate the presence of allithiamine in pepper seeds. Accumulation of allithiamine in pepper seeds was clearly demonstrated by HPLC and HPLC-MS measurements.

In another part of our experiments with allithiamine, we aimed to investigate the effect of allithiamine on changes caused by hyperglycaemia *in vitro*. Collectively, we provided the evidence that – without influencing viability, necrosis or apoptosis of HUVECs – allithiamine attenuates the negative effects caused by elevated glucose level by inhibiting the expression of NF- κ B, the release of pro-inflammatory cytokine and the formation of AGEs due to its potent antioxidant effect and a mechanism unrelated to transketolase activity.

Further studies are needed to elucidate the mechanisms of action of PAF and allithiamine, however, PAF and allithiamine may have therapeutic potential in diseases in which endothelial dysfunction caused by inflammation and hyperglycaemia is a pathogenetic factor.

11. Irodalom

- Aboonabi A., Singh I. (2015) Chemopreventive role of anthocyanins in atherosclerosis via activation of Nrf2-ARE as an indicator and modulator of redox. *Biomedicine Pharmacotherapy* 72:30-6. DOI: 10.1016/j.biopha.2015.03.008.
- Ahmad M.S., Pischetsrieder M., Ahmed N. (2007) Aged garlic extract and S-allyl cysteine prevent formation of advanced glycation endproducts. *European Journal of Pharmacology* 561:32-8. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.01.041.
- Alappat B., Alappat J. (2020) Anthocyanin pigments: beyond aesthetics. *Molecules (Basel, Switzerland)* 25:5500. DOI: 10.3390/molecules25235500.
- Aleshin V.A., Mkrtychyan G.V., Bunik V.I. (2019) Mechanisms of non-coenzyme action of thiamine: protein targets and medical significance. *Biochemistry (Moscow)* 84:829-850. DOI: 10.1134/S0006297919080017.
- Alvarez-Suarez J.M., Giampieri F., Tulipani S., Casoli T., Di Stefano G., González-Paramás A.M., Santos-Buelga C., Busco F., Quiles J.L., Cordero M.D., Bompadre S., Mezzetti B., Battino M. (2014) One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25:289-294. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2013.11.002.
- American Diabetes A. (2010) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 33 Suppl 1:S62-S69. DOI: 10.2337/dc10-S062.
- Ananieva E.A., Conway M.E. (2020) Branched-chain amino metabolism, Reference Module in Life Sciences, Elsevier.
- Appay V., Rowland-Jones S.L. (2001) RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends in Immunology* 22:83-7. DOI: 10.1016/s1471-4906(00)01812-3.
- Arima M., Fukuda T. (2011) Prostaglandin D₂ and T(H)₂ inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma. *The Korean Journal of Internal Medicine* 26:8-18. DOI: 10.3904/kjim.2011.26.1.8.
- Balakumar P., Chakkarwar V.A., Singh M. (2009) Ameliorative effect of combination of benfotiamine and fenofibrate in diabetes-induced vascular endothelial dysfunction and nephropathy in the rat. *Molecular and Cellular Biochemistry* 320:149-62. DOI: 10.1007/s11010-008-9917-z.
- 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.
- Bays H.E., Chapman R.H., Grandy S., Group S.I. (2007) The relationship of body mass index to diabetes mellitus, hypertension and dyslipidaemia: comparison of data from two national surveys. *International Journal of Clinical Practice* 61:737-747. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2007.01336.x.
- Belwal T., Nabavi S.F., Nabavi S.M., Habtemariam S. (2017) Dietary anthocyanins and insulin resistance: when food becomes a medicine. *Nutrients* 9:1111. DOI: 10.3390/nu9101111.
- Berrone E., Beltramo E., Solimine C., Ape A.U., Porta M. (2006) Regulation of intracellular glucose and polyol pathway by thiamine and benfotiamine in vascular cells cultured in high glucose. *Journal of Biological Chemistry* 281:9307-13. DOI: 10.1074/jbc.M600418200.
- Bertani B., Ruiz N. (2018) Function and biogenesis of lipopolysaccharides. *EcoSal Plus* 8:10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018.

- Bettendorff L., Wins P. (2013) Biological functions of thiamine derivatives: focus on non-coenzyme roles. *Biochemistry* 1(1):10. DOI: 10.13172/2052-9651-5-1-860
- Bettors D.M. (2015) Use of flow cytometry in clinical practice. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology* 6:435-440. DOI: 10.6004/jadpro.2015.6.5.4.
- Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal* 5:9-19. DOI: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
- Borges F., Fernandes E., Roleira F. (2002) Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* 9:195-217. DOI: 10.2174/0929867023371229.
- Bowtell J.L., Summers D.P., Dyer A., Fox P., Mileva K.N. (2011) Montmorency cherry juice reduces muscle damage caused by intensive strength exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 43:1544-51. DOI: 10.1249/MSS.0b013e31820e5adc.
- Brock T.G., McNish R.W., Peters-Golden M. (1999) Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. *Journal of Biological Chemistry* 274:11660-6. DOI: 10.1074/jbc.274.17.11660.
- Brown J.E., Kelly M.F. (2007) Inhibition of lipid peroxidation by anthocyanins, anthocyanidins and their phenolic degradation products. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109:66-71. DOI: 10.1002/ejlt.200600166.
- Brownlee M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-20. DOI: 10.1038/414813a.
- Brownlee M. (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54:1615-25. DOI: 10.2337/diabetes.54.6.1615.
- Bunik V.I., Fernie A.R. (2009) Metabolic control exerted by the 2-oxoglutarate dehydrogenase reaction: a cross-kingdom comparison of the crossroad between energy production and nitrogen assimilation. *Biochemical Journal* 422:405-21. DOI: 10.1042/bj20090722.
- Cabrera L. (2015) A novel acylated anthocyanin with a linear trisaccharide from flowers of *Convolvulus althaeoides*. *Natural Product Communications* 10:1965-8.
- Cameron N.E., Gibson T.M., Nangle M.R., Cotter M.A. (2005) Inhibitors of advanced glycation end product formation and neurovascular dysfunction in experimental diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043:784-92. DOI: 10.1196/annals.1333.091.
- Cardenas D. (2013) Let not thy food be confused with thy medicine: the hippocratic misquotation. *e-SPEN Journal* 8:e260-e262. DOI: 10.1016/j.clnme.2013.10.002p.
- Carpenter K.J. (2012) The discovery of thiamin. *Annals of Nutrition and Metabolism* 61:219-23. DOI: 10.1159/000343109.
- Cassidy A., Bertoia M., Chiuve S., Flint A., Forman J., Rimm E.B. (2016) Habitual intake of anthocyanins and flavanones and risk of cardiovascular disease in men. *The American Journal of Clinical Nutrition* 104:587-94. DOI: 10.3945/ajcn.116.133132.
- Cassidy A., Mukamal K.J., Liu L., Franz M., Eliassen A.H., Rimm E.B. (2013) High anthocyanin intake is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young and middle-aged women. *Circulation* 127:188-196. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.122408.
- Chang A.K., Duggleby R.G. (1997) Expression, purification and characterization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *Biochemical Journal* 327 (Pt 1):161-9. DOI: 10.1042/bj3270161.
- Chatterjee A., Komshian S., Sansbury B.E., Wu B., Mottola G., Chen M., Spite M., Conte M.S. (2017) Biosynthesis of proresolving lipid mediators by vascular cells and tissues. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 31:3393-3402. DOI: 10.1096/fj.201700082R.

- 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.
- Cheng J., Wei G., Zhou H., Gu C., Vimolmangkang S., Liao L., Han Y. (2014) Unraveling the mechanism underlying the glycosylation and methylation of anthocyanins in peach. *Plant Physiology* 166:1044-58. DOI: 10.1104/pp.114.246876.
- Cisowska A., Wojnicz D., Hendrich A.B. (2011) Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Natural Product Communications* 6:149-56.
- Collie J.T.B., Greaves R.F., Jones O.A.H., Lam Q., Eastwood G.M., Bellomo R. (2017) Vitamin B₁ in critically ill patients: needs and challenges. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 55:1652-1668. DOI: 10.1515/cclm-2017-0054.
- Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., Vlietinck A.J., Vanden Berghe D. (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products* 61:71-6. DOI: 10.1021/np970237h.
- Crampton S.P., Davis J., Hughes C.C.W. (2007) Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Journal of visualized experiments : Journal of Visualized Experiments* 183-183. DOI: 10.3791/183.
- Dev A., Iyer S., Razani B., Cheng G. (2011) NF- κ B and innate immunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 349:115-43. DOI: 10.1007/82_2010_102.
- Dhir S., Tarasenko M., Napoli E., Giulivi C. (2019) Neurological, psychiatric, and biochemical aspects of thiamine deficiency in children and adults. *Frontiers in Psychiatry* 10:207-207. DOI: 10.3389/fpsyt.2019.00207.
- Dirlewanger E., Claverie J., Iezzoni A.F., Wünsch A. (2009) Sweet and sour cherries: linkage maps, QTL detection and marker assisted selection, in: K. M. Folta and S. E. Gardiner (Eds.), *Genetics and Genomics of Rosaceae*, Springer New York, New York, NY. pp. 291-313.
- Domitrovic R. (2011) The molecular basis for the pharmacological activity of anthocyanins. *Current Medicinal Chemistry* 18:4454-69. DOI: 10.2174/092986711797287601.
- Dorris S.L., Peebles R.S., Jr. (2012) PGI₂ as a regulator of inflammatory diseases. *Mediators of Inflammation* 2012:926968. DOI: 10.1155/2012/926968.
- Dreiseitel A., Korte G., Schreier P., Oehme A., Locher S., Hajak G., Sand P.G. (2009) sPhospholipase A(2) is inhibited by anthocyanidins. *Journal of Neural Transmission (Vienna)* 116:1071-7. DOI: 10.1007/s00702-009-0268-z.
- Du X.L., Edelstein D., Rossetti L., Fantus I.G., Goldberg H., Ziyadeh F., Wu J., Brownlee M. (2000) Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 97:12222-6. DOI: 10.1073/pnas.97.22.12222.
- Dyatlov V.A. (1994) Effect of thiamine on the processes responsible for acetylcholine secretion in the frog neuromuscular synapses. *Neurophysiology* 26:243-249. DOI: 10.1007/BF01053734.
- Egi Y., Kawasaki T. (2003) Thiamin | properties and determination, in: B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, Academic Press, Oxford. pp. 5767-5772.
- Eidi A., Eidi M., Esmaeili E. (2006) Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine* 13:624-9. DOI: 10.1016/j.phymed.2005.09.010.

- Eisenreich W., Schwarz M., Cartayrade A., Arigoni D., Zenk M.H., Bacher A. (1998) The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chemistry & Biology* 5:R221-33. DOI: 10.1016/s1074-5521(98)90002-3.
- Eruslanov E., Kusmartsev S. (2010) Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods in Molecular Biology* 594:57-72. DOI: 10.1007/978-1-60761-411-1_4.
- Fam S.S., Morrow J.D. (2003) The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation—a review. *Current Medicinal Chemistry* 10:1723-40. DOI: 10.2174/0929867033457115.
- Farr J.E., Sigurdson G.T., Giusti M.M. (2019) Stereochemistry and glycosidic linkages of C3-glycosylations affected the reactivity of cyanidin derivatives. *Food Chemistry* 278:443-451. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.11.076.
- Filippi M.-D. (2016) Mechanism of Diapedesis: Importance of the transcellular route. *Advances in Immunology* 129:25-53. DOI: 10.1016/bs.ai.2015.09.001.
- Fitzpatrick T.B., Chapman L.M. (2020) The importance of thiamine (vitamin B(1)) in plant health: from crop yield to biofortification. *The Journal of Biological Chemistry* 295:12002-12013. DOI: 10.1074/jbc.REV120.010918.
- Foulon V., Antonenkov V.D., Croes K., Waelkens E., Mannaerts G.P., Van Veldhoven P.P., Casteels M. (1999) Purification, molecular cloning, and expression of 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase, a peroxisomal thiamine pyrophosphate-dependent enzyme that catalyzes the carbon-carbon bond cleavage during alpha-oxidation of 3-methyl-branched fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 96:10039-44. DOI: 10.1073/pnas.96.18.10039.
- Fraccascia P., Casteels M., De Schryver E., Van Veldhoven P.P. (2011) Role of thiamine pyrophosphate in oligomerisation, functioning and import of peroxisomal 2-hydroxyacyl-CoA lyase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1814:1226-33. DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.06.007.
- FruitVeB. (2020) Zöldségtermesztés I. rész, <https://fruitveb.hu/fruitveb-bulletin-2019-zoldsegtermesztes-i-resz/>.
- Fujiwara M., Watanabe H., Matsui K. (1954) Allithiamine a newly found derivative of vitamin B1: I Discovery of allithiamine. *The Journal of Biochemistry* 41:29-39. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a126421.
- Funk S.D., Yurdagül 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.
- Gadau S., Emanuelli C., Van Linthout S., Graiani G., Todaro M., Meloni M., Campesi I., Invernici G., Spillmann F., Ward K., Madeddu P. (2006) Benfotiamine accelerates the healing of ischaemic diabetic limbs in mice through protein kinase B/Akt-mediated potentiation of angiogenesis and inhibition of apoptosis. *Diabetologia* 49:405-20. DOI: 10.1007/s00125-005-0103-5.
- Gibson G.E., Blass J.P., Beal M.F., Bunik V. (2005) The alpha-ketoglutarate-dehydrogenase complex: a mediator between mitochondria and oxidative stress in neurodegeneration. *Molecular Neurobiology* 31:43-63. DOI: 10.1385/mn:31:1-3:043.
- Gołda A., Szyniarowski P., Ostrowska K., Kozik A., Rapała-Kozik M. (2004) Thiamine binding and metabolism in germinating seeds of selected cereals and legumes. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:187-95. DOI: 10.1016/j.plaphy.2004.01.002.
- Goyer A. (2010) Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry* 71:1615-1624. DOI: 10.1016/j.phytochem.2010.06.022.

- Gyurászová M., Kovalčíková A., Janšáková K., Šebeková K., Celec P., Tóthová Ľ. (2018) Markers of oxidative stress and antioxidant status in the plasma, urine and saliva of healthy mice. *Physiological Research* 67:921-934. DOI: 10.33549/physiolres.933866.
- 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.
- Harisa G.I. (2013) Benfotiamine enhances antioxidant defenses and protects against cisplatin-induced DNA damage in nephrotoxic rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 27:398-405. DOI: 10.1002/jbt.21501.
- Haseeb A., Chen D., Haqqi T.M. (2013) Delphinidin inhibits IL-1 β -induced activation of NF- κ B by modulating the phosphorylation of IRAK-1(Ser376) in human articular chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)* 52:998-1008. DOI: 10.1093/rheumatology/kes363.
- Hassellund S.S., Flaa A., Kjeldsen S.E., Seljeflot I., Karlsen A., Erlund I., Rostrup M. (2013) Effects of anthocyanins on cardiovascular risk factors and inflammation in pre-hypertensive men: a double-blind randomized placebo-controlled crossover study. *Journal of Human Hypertension* 27:100-6. DOI: 10.1038/jhh.2012.4.
- Hegedűs A. (2012) Természetes antioxidáns-forrásunk: a gyümölcs Debreceni Egyetem, AGTC, Kertészettudományi Intézet.
- Heo H.J., Lee C.Y. (2005) Strawberry and Its Anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1984-1989. DOI: 10.1021/jf048616l.
- Hernández-Ortega M., Ortiz-Moreno A., Hernández-Navarro M.D., Chamorro-Cevallos G., Dorantes-Alvarez L., Necochea-Mondragón H. (2012) Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory effects of carotenoids extracted from dried pepper (*Capsicum annum* L.). *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012:524019. DOI: 10.1155/2012/524019.
- Heyman L., Axling U., Blanco N., Sterner O., Holm C., Berger K. (2014) Evaluation of beneficial metabolic effects of berries in high-fat fed C57BL/6J mice. *Journal of Nutrition and Metabolism* 2014:403041. DOI: 10.1155/2014/403041.
- 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.
- Homoki J.R., Nemes A., Fazekas E., Gyémánt G., Balogh P., Gál F., Al-Asri J., Mortier J., Wolber G., Babinszky L., Remenyik J. (2016) Anthocyanin composition, antioxidant efficiency, and α -amylase inhibitor activity of different Hungarian sour cherry varieties (*Prunus cerasus* L.). *Food Chemistry* 194:222-9. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.130.
- Hou D.X., Yanagita T., Uto T., Masuzaki S., Fujii M. (2005) Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. *Biochemical Pharmacology* 70:417-25. DOI: 10.1016/j.bcp.2005.05.003.
- Hrotkó K. (2003) Cseresznye és meggy. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- Hu K., Yang J., Tanaka S., Gonias S.L., Mars W.M., Liu Y. (2006) Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 281:2120-7. DOI: 10.1074/jbc.M504988200.
- Huang W.-Y., Wang J., Liu Y.-M., Zheng Q.-S., Li C.-Y. (2014) Inhibitory effect of malvidin on TNF- α -induced inflammatory response in endothelial cells. *European Journal of Pharmacology* 723:67-72. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.11.041.

- Huang W., Yan Z., Li D., Ma Y., Zhou J., Sui Z. (2018) Antioxidant and anti-inflammatory effects of blueberry anthocyanins on high glucose-induced human retinal capillary endothelial cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018:1862462. DOI: 10.1155/2018/1862462.
- Hwang Y.P., Choi J.H., Han E.H., Kim H.G., Wee J.H., Jung K.O., Jung K.H., Kwon K.I., Jeong T.C., Chung Y.C., Jeong H.G. (2011) Purple sweet potato anthocyanins attenuate hepatic lipid accumulation through activating adenosine monophosphate-activated protein kinase in human HepG2 cells and obese mice. *Nutrition Research* 31:896-906. DOI: 10.1016/j.nutres.2011.09.026.
- Idriss H.T., Naismith J.H. (2000) TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique* 50:184-95. DOI: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::Aid-jemt2>3.0.Co;2-h.
- Imig J.D. (2020) Eicosanoid blood vessel regulation in physiological and pathological states. *Clinical science (London)* 134:2707-2727. DOI: 10.1042/cs20191209.
- Izzo A.A., Deutsch D.G. (2011) Unique pathway for anandamide synthesis and liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:6339-6340. DOI: 10.1073/pnas.1103566108.
- 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.
- Jankowski A., Jankowska B., Niedworok J. (2000) [The effect of anthocyanin dye from grapes on experimental diabetes]. *Folia Medica Cracoviensia* 41:5-15.
- Joshi Y.B., Praticò D. (2015) The 5-lipoxygenase pathway: oxidative and inflammatory contributions to the Alzheimer's disease phenotype. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8:436-436. DOI: 10.3389/fncel.2014.00436.
- Kähkönen M.P., Heinämäki J., Ollilainen V., Heinonen M. (2003) Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83:1403-1411. DOI: 10.1002/jsfa.1511.
- Kähkönen M.P., Heinonen M. (2003) Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:628-33. DOI: 10.1021/jf025551i.
- Kang Z., Zeng J., Zhang T., Lin S., Gao J., Jiang C., Fan R., Yin D. (2019) Hyperglycemia induces NF- κ B activation and MCP-1 expression via downregulating GLP-1R expression in rat mesangial cells: inhibition by metformin. *Cell Biology International* 43:940-953. DOI: 10.1002/cbin.11184.
- Karlsen A., Retterstøl L., Laake P., Paur I., Bøhn S.K., Sandvik L., Blomhoff R. (2007) Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J Nutr* 137:1951-4. DOI: 10.1093/jn/137.8.1951.
- Kawasaki T., Kawai T. (2014) Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology* 5:461-461. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00461.
- 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.
- Keane K.M., George T.W., Constantinou C.L., Brown M.A., Clifford T., Howatson G. (2016) Effects of Montmorency tart cherry (*Prunus Cerasus* L.) consumption on vascular

- function in men with early hypertension. *The American Journal of Clinical Nutrition* 103:1531-9. DOI: 10.3945/ajcn.115.123869.
- Kelley D.S., Adkins Y., Laugero K.D. (2018) A review of the health benefits of cherries. *Nutrients* 10:368. DOI: 10.3390/nu10030368.
- Khanapure S.P., Garvey D.S., Janero D.R., Letts L.G. (2007) Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 7:311-40. DOI: 10.2174/156802607779941314.
- Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., Lim S.M. (2017) Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research* 61:1361779-1361779. DOI: 10.1080/16546628.2017.1361779.
- Knaup B., Oehme A., Valotis A., Schreier P. (2009) Anthocyanins as lipoxygenase inhibitors. *Molecular Nutrition & Food Research* 53:617-24. DOI: 10.1002/mnfr.200800234.
- Kruger N.J., von Schaewen A. (2003) The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology* 6:236-46. DOI: 10.1016/s1369-5266(03)00039-6.
- Kwon M.J., Song Y.S., Choi M.S., Song Y.O. (2003) Red pepper attenuates cholesteryl ester transfer protein activity and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Clinica Chimica Acta* 332:37-44. DOI: 10.1016/s0009-8981(03)00118-9.
- Kwon S.H., Ahn I.S., Kim S.O., Kong C.S., Chung H.Y., Do M.S., Park K.Y. (2007) Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins. *Journal of Medicinal Food* 10:552-6. DOI: 10.1089/jmf.2006.147.
- Lamalice L., Le Boeuf F., Huot J. (2007) Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation Research* 100:782-794. DOI: 10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e.
- Lantos F. (2018) A paprika fajok eredete. Szentes Városért Közalapítvány, és a duna-r Vetőmag Kft.
- Lauridsen C. (2019) From oxidative stress to inflammation: redox balance and immune system. *Poultry Science* 98:4240-4246. DOI: 10.3382/ps/pey407.
- LeClere S., Rampey R.A., Bartel B. (2004) IAR4, a gene required for auxin conjugate sensitivity in Arabidopsis, encodes a pyruvate dehydrogenase E1alpha homolog. *Plant physiology* 135:989-999. DOI: 10.1104/pp.104.040519.
- Lee H.H., Lee S.G., Shin J.S., Lee H.Y., Yoon K., Ji Y.W., Jang D.S., Lee K.T. (2017) p-Coumaroyl anthocyanin mixture isolated from tuber epidermis of solanum tuberosum attenuates reactive oxygen species and pro-inflammatory mediators by suppressing NF- κ B and STAT1/3 signaling in LPS-induced RAW264.7 macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 40:1894-1902. DOI: 10.1248/bpb.b17-00362.
- Leslie R.D.G., Cohen R.M. (2009) Biologic variability in plasma glucose, hemoglobin A1c, and advanced glycation end products associated with diabetes complications. *Journal of Diabetes Science and Technology* 3:635-643. DOI: 10.1177/193229680900300403.
- Li P., Li Y.J., Zhang F.J., Zhang G.Z., Jiang X.Y., Yu H.M., Hou B.K. (2017) The Arabidopsis UDP-glycosyltransferases UGT79B2 and UGT79B3, contribute to cold, salt and drought stress tolerance via modulating anthocyanin accumulation. *The Plant Journal* 89:85-103. DOI: 10.1111/tpj.13324.
- Li S., Wu B., Fu W., Reddivari L. (2019) The anti-inflammatory effects of dietary anthocyanins against ulcerative colitis. *International Journal of Molecular Sciences* 20. DOI: 10.3390/ijms20102588.
- Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P. (2018) Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging* 13:757-772. DOI: 10.2147/CIA.S158513.

- Limtrakul P., Yodkeeree S., Pitchakarn P., Punfa W. (2015) Suppression of inflammatory responses by black rice extract in RAW 264.7 macrophage cells via downregulation of NF- κ B and AP-1 signaling pathways. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16:4277-83. DOI: 10.7314/apjcp.2015.16.10.4277.
- Lin B.-W., Gong C.-C., Song H.-F., Cui Y.-Y. (2017) Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *British Journal of Pharmacology* 174:1226-1243. DOI: 10.1111/bph.13627.
- Lipsky P.E., Brooks P., Crofford L.J., DuBois R., Graham D., Simon L.S., van de Putte L.B., Abramson S.B. (2000) Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease. *Archives of Internal Medicine* 160:913-20. DOI: 10.1001/archinte.160.7.913.
- Lo P.K., Chen J.Y., Tang P.P., Lin J., Lin C.H., Su L.T., Wu C.H., Chen T.L., Yang Y., Wang F.F. (2001) Identification of a mouse thiamine transporter gene as a direct transcriptional target for p53. *Journal of Biological Chemistry* 276:37186-93. DOI: 10.1074/jbc.M104701200.
- Lobell M., Crout D.H.G. (1996) Pyruvate Decarboxylase: A molecular modeling study of pyruvate decarboxylation and acyloin formation. *Journal of the American Chemical Society* 118:1867-1873. DOI: 10.1021/ja951830t.
- Lone A.M., Taskén K. (2013) Proinflammatory and immunoregulatory roles of eicosanoids in T cells. *Frontiers in Immunology* 4:130-130. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00130.
- Louis X.L., Murphy R., Thandapilly S.J., Yu L., Netticadan T. (2012) Garlic extracts prevent oxidative stress, hypertrophy and apoptosis in cardiomyocytes: a role for nitric oxide and hydrogen sulfide. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12:140-140. DOI: 10.1186/1472-6882-12-140.
- 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.
- Luís Â., Domingues F., Pereira L. (2018) Association between berries intake and cardiovascular diseases risk factors: a systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis of randomized controlled trials. *Food & Function* 9:740-757. DOI: 10.1039/c7fo01551h.
- Martin K.R., Bopp J., Burrell L., Hook G. (2011) The effect of 100% tart cherry juice on serum uric acid levels, biomarkers of inflammation and cardiovascular disease risk factors. *The Federation of American Societies for Experimental Biology* 25:339.2-339.2. DOI: https://doi.org/10.1096/fasebj.25.1_supplement.339.2.
- Matera R., Gabbanini S., Berretti S., Amorati R., De Nicola G.R., Iori R., Valgimigli L. (2015) Acylated anthocyanins from sprouts of *Raphanus sativus* cv. Sango: isolation, structure elucidation and antioxidant activity. *Food Chemistry* 166:397-406. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.06.056.
- 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.
- Mc Namara K., Alzubaidi H., Jackson J.K. (2019) Cardiovascular disease as a leading cause of death: how are pharmacists getting involved? *Integrated Pharmacy Research & Practice* 8:1-11. DOI: 10.2147/IPRP.S133088.
- McLure K.G., Takagi M., Kastan M.B. (2004) NAD⁺ modulates p53 DNA binding specificity and function. *Molecular and Cellular Biology* 24:9958-9967. DOI: 10.1128/MCB.24.22.9958-9967.2004.

- Melino S., Leo S., Toska Papajani V. (2019) Natural hydrogen sulfide donors from *Allium* sp. as a nutraceutical approach in type 2 diabetes prevention and therapy. *Nutrients* 11. DOI: 10.3390/nu11071581.
- Mkrtchyan G., Aleshin V., Parkhomenko Y., Kaehne T., Luigi Di Salvo M., Parroni A., Contestabile R., Vovk A., Bettendorff L., Bunik V. (2015) Molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin in brain: biochemical, structural and pathway analysis. *Scientific Reports* 5:12583. DOI: 10.1038/srep12583.
- Mouradov A., Spangenberg G. (2014) Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Frontiers in Plant Science* 5:620. DOI: 10.3389/fpls.2014.00620.
- Murakami M., Nakatani Y., Kuwata H., Kudo I. (2000) Cellular components that functionally interact with signaling phospholipase A(2)s. *Biochimica et Biophysica Acta* 1488:159-66. DOI: 10.1016/s1388-1981(00)00118-9.
- Naito E., Ito M., Yokota I., Saijo T., Matsuda J., Kuroda Y. (1998) Thiamine-responsive lactic acidemia: role of pyruvate dehydrogenase complex. *European Journal of Pediatrics* 157:648-52. DOI: 10.1007/s004310050903.
- Navale A.M., Paranjape A.N. (2016) Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophysical Reviews* 8:5-9. DOI: 10.1007/s12551-015-0186-2.
- Navarro D., Zwingmann C., Butterworth R.F. (2008) Impaired oxidation of branched-chain amino acids in the medial thalamus of thiamine-deficient rats. *Metabolic Brain Disease* 23:445-55. DOI: 10.1007/s11011-008-9105-6.
- Ng V.Y., Huang Y., Reddy L.M., Falck J.R., Lin E.T., Kroetz D.L. (2007) Cytochrome P450 eicosanoids are activators of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Drug Metabolism and Disposition* 35:1126-34. DOI: 10.1124/dmd.106.013839.
- Nghiêm H.O., Bettendorff L., Changeux J.P. (2000) Specific phosphorylation of Torpedo 43K rapsyn by endogenous kinase(s) with thiamine triphosphate as the phosphate donor. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 14:543-54. DOI: 10.1096/fasebj.14.3.543.
- Noh H., King G.L. (2007) The role of protein kinase C activation in diabetic nephropathy. *Kidney International* 72:S49-S53. DOI: 10.1038/sj.ki.5002386.
- Nyéki J., Soltész M., Popovics L., Szabó T., Thurzó S., Holb I.J., Fári M.G., Veres Z., Harsányi G., Szabó Z. (2005) Strategy of the sour cherry verticum in the Northern Great Plain Region Hungary (Analytic study). *International Journal of Horticultural Science* 11:7-31. DOI: 10.31421/IJHS/11/4/601.
- Obrenovich M.E., Monnier V.M. (2003) Vitamin B₁ blocks damage caused by hyperglycemia. *Science of Aging Knowledge Environment* 2003:Pe6. DOI: 10.1126/sageke.2003.10.pe6.
- Oláh A., Markovics A., Szabó-Papp J., Szabó P.T., Stott C., Zouboulis C.C., Bíró T. (2016) Differential effectiveness of selected non-psychotropic phytocannabinoids on human sebocyte functions implicates their introduction in dry/seborrheic skin and acne treatment. *Experimental Dermatology* 25:701-7. DOI: 10.1111/exd.13042.
- Osiezgha K., Ali S., Freeman C., Barker N.C., Jabeen S., Maitra S., Olagbemi Y., Richie W., Bailey R.K. (2013) Thiamine deficiency and delirium. *Innovations in Clinical Neuroscience* 10:26-32.
- Otunola G.A., Oloyede O.B., Oladiji A.T., Afolayan A.J. (2014) Selected spices and their combination modulate hypercholesterolemia-induced oxidative stress in experimental rats. *Biological Research* 47:5-5. DOI: 10.1186/0717-6287-47-5.

- Paixão J., Dinis T.C., Almeida L.M. (2012) Malvidin-3-glucoside protects endothelial cells up-regulating endothelial NO synthase and inhibiting peroxynitrite-induced NF- κ B activation. *Chemico-Biological Interactions* 199:192-200. DOI: 10.1016/j.cbi.2012.08.013.
- Parkhomenko Y.M., Protasova Z.S., Yanchiy O.R., Khosla K., Donchenko G.V. (2001) Localization of thiamine-binding protein in synaptosomes from the rat brain. *Neurophysiology* 33:135-139. DOI: 10.1023/A:1012840417285.
- Peirson S.N., Butler J.N. (2007) Quantitative polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology* 362:349-62. DOI: 10.1007/978-1-59745-257-1_25.
- Perrone A., Giovino A., Benny J., Martinelli F. (2020) Advanced glycation end products (AGEs): biochemistry, signaling, analytical methods, and epigenetic effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020:3818196. DOI: 10.1155/2020/3818196.
- Pigeon W.R., Carr M., Gorman C., Perlis M.L. (2010) Effects of a tart cherry juice beverage on the sleep of older adults with insomnia: a pilot study. *Journal of Medicinal Food* 13:579-83. DOI: 10.1089/jmf.2009.0096.
- Pries A.R., Kuebler W.M. (2006) Normal endothelium. *Handbook of Experimental Pharmacology* 1-40. DOI: 10.1007/3-540-32967-6_1.
- Punchard N.A., Whelan C.J., Adcock I. (2004) The Journal of Inflammation. *Journal of inflammation (London, England)* 1:1-1. DOI: 10.1186/1476-9255-1-1.
- Qazi B.S., Tang K., Qazi A. (2011) Recent advances in underlying pathologies provide insight into interleukin-8 expression-mediated inflammation and angiogenesis. *International Journal of Inflammation* 2011:908468. DOI: 10.4061/2011/908468.
- Qin Y., Xia M., Ma J., Hao Y., Liu J., Mou H., Cao L., Ling W. (2009) Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 90:485-92. DOI: 10.3945/ajcn.2009.27814.
- Ramot Y., Alam M., Oláh A., Bíró T., Ponce L., Chéret J., Bertolini M., Paus R. (2018) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ -mediated signaling regulates mitochondrial energy metabolism in human hair follicle epithelium. *Journal of Investigative Dermatology* 138:1656-1659. DOI: 10.1016/j.jid.2018.01.033.
- Rapala-Kozik M. (2011) Vitamin B1 (Thiamine): A cofactor for enzymes involved in the main metabolic pathways and an environmental stress protectant, in: F. Rébeillé and R. Douce (Eds.), *Advances in Botanical Research*, Academic Press. pp. 37-91.
- Reis J.F., Monteiro V.V.S., de Souza Gomes R., do Carmo M.M., da Costa G.V., Ribera P.C., Monteiro M.C. (2016) Action mechanism and cardiovascular effect of anthocyanins: a systematic review of animal and human studies. *Journal of Translational Medicine* 14:315-315. DOI: 10.1186/s12967-016-1076-5.
- Ricciotti E., FitzGerald G.A. (2011) Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 31:986-1000. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.207449.
- Rindi G., Laforenza U. (2000) Thiamine intestinal transport and related issues: recent aspects. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 224:246-55. DOI: 10.1046/j.1525-1373.2000.22428.x.
- Rios E.C., Szczesny B., Soriano F.G., Olah G., Szabo C. (2015) Hydrogen sulfide attenuates cytokine production through the modulation of chromatin remodeling. *International Journal of Molecular Medicine* 35:1741-6. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2176.
- Rodler I. (2005) Új tápanyagtáblázat. *Medicina*, Budapest.

- Roghani M., Baluchnejadmojarad T., Sohrabi Z., Sadeghi M. (2004) Anti-hyperlycemic and hypolipidemic effect of oral administration of *Capsicum frutescens* in male STZ-diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants* 3:47-52+XVII.
- Rouzer C.A., Marnett L.J. (2009) Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of Lipid Research* 50 Suppl:S29-34. DOI: 10.1194/jlr.R800042-JLR200.
- Rowland I., Gibson G., Heinken A., Scott K., Swann J., Thiele I., Tuohy K. (2018) Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition* 57:1-24. DOI: 10.1007/s00394-017-1445-8.
- Salehi B., Sharifi-Rad J., Cappellini F., Reiner Ž., Zorzan D., Imran M., Sener B., Kilic M., El-Shazly M., Fahmy N.M., Al-Sayed E., Martorell M., Tonelli C., Petroni K., Docea A.O., Calina D., Maroyi A. (2020) The therapeutic potential of anthocyanins: current approaches based on their molecular mechanism of action. *Frontiers in Pharmacology* 11:1300-1300. DOI: 10.3389/fphar.2020.01300.
- Sandoo A., van Zanten J.J.C.S.V., Metsios G.S., Carroll D., Kitis G.D. (2010) The endothelium and its role in regulating vascular tone. *The Open Cardiovascular Medicine Journal* 4:302-312. DOI: 10.2174/1874192401004010302.
- Sarić A., Sobocanec S., Balog T., Kusić B., Sverko V., Dragović-Uzelac V., Levaj B., Cosić Z., Macak Safranko Z., Marotti T. (2009) Improved antioxidant and anti-inflammatory potential in mice consuming sour cherry juice (*Prunus Cerasus* cv. Maraska). *Plant Foods for Human Nutrition* 64:231-7. DOI: 10.1007/s11130-009-0135-y.
- 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.
- Schnellbaecher A., Binder D., Bellmaine S., Zimmer A. (2019) Vitamins in cell culture media: Stability and stabilization strategies. *Biotechnology and Bioengineering* 116:1537-1555. DOI: 10.1002/bit.26942.
- Schreiber H.D., Swink A.M., Godsey T.D. (2010) The chemical mechanism for Al³⁺ complexing with delphinidin: a model for the bluing of hydrangea sepals. *Journal of Inorganic Biochemistry* 104:732-9. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2010.03.006.
- Seymour E.M., Lewis S.K., Urcuyo-Llanes D.E., Tanone, II, Kirakosyan A., Kaufman P.B., Bolling S.F. (2009) Regular tart cherry intake alters abdominal adiposity, adipose gene transcription, and inflammation in obesity-prone rats fed a high fat diet. *Journal of Medicinal Food* 12:935-42. DOI: 10.1089/jmf.2008.0270.
- Seymour E.M., Singer A.A., Kirakosyan A., Urcuyo-Llanes D.E., Kaufman P.B., Bolling S.F. (2008) Altered hyperlipidemia, hepatic steatosis, and hepatic peroxisome proliferator-activated receptors in rats with intake of tart cherry. *Journal of Medicinal Food* 11:252-9. DOI: 10.1089/jmf.2007.658.
- Shi M.-Z., Xie D.-Y. (2014) Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *Arabidopsis thaliana*. *Recent Patents on Biotechnology* 8:47-60. DOI: 10.2174/1872208307666131218123538.
- Shi Q., Karuppagounder S.S., Xu H., Pechman D., Chen H., Gibson G.E. (2007) Responses of the mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex to thiamine deficiency may contribute to regional selective vulnerability. *Neurochemistry International* 50:921-31. DOI: 10.1016/j.neuint.2007.03.010.
- Shi Y., Liu C.H., Roberts A.I., Das J., Xu G., Ren G., Zhang Y., Zhang L., Yuan Z.R., Tan H.S., Das G., Devadas S. (2006) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Research* 16:126-33. DOI: 10.1038/sj.cr.7310017.

- Smyth E.M. (2010) Thromboxane and the thromboxane receptor in cardiovascular disease. *Clinical Lipidology* 5:209-219. DOI: 10.2217/clp.10.11.
- Soares-Fernandes J.P., Teixeira-Gomes R., Cruz R., Ribeiro M., Magalhães Z., Rocha J.F., Leijser L.M. (2008) Neonatal pyruvate dehydrogenase deficiency due to a R302H mutation in the PDHA1 gene: MRI findings. *Pediatric Radiology* 38:559-62. DOI: 10.1007/s00247-007-0721-9.
- Song W.-Y., Ku K.-H., Choi J.-H. (2010) Effect of ethanol extracts from red pepper seeds on antioxidative defense system and oxidative stress in rats fed high-fat . high-cholesterol diet. *Nutrition Research and Practice* 4:11-15. DOI: 10.4162/nrp.2010.4.1.11.
- Sonnweber T., Pizzini A., Nairz M., Weiss G., Tancevski I. (2018) Arachidonic acid metabolites in cardiovascular and metabolic diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 19:3285. DOI: 10.3390/ijms19113285.
- Sperringer J.E., Addington A., Hutson S.M. (2017) Branched-chain amino acids and brain metabolism. *Neurochemical Research* 42:1697-1709. DOI: 10.1007/s11064-017-2261-5.
- Steven S., Frenis K., Oelze M., Kalinovic S., Kuntic M., Bayo Jimenez M.T., Vujacic-Mirski K., Helmstädter J., Kröller-Schön S., Münzel T., Daiber A. (2019) Vascular inflammation and oxidative stress: major triggers for cardiovascular disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019:7092151. DOI: 10.1155/2019/7092151.
- Stincone A., Prigione A., Cramer T., Wamelink M.M.C., Campbell K., Cheung E., Olin-Sandoval V., Grüning N.-M., Krüger A., Tauqeer Alam M., Keller M.A., Breitenbach M., Brindle K.M., Rabinowitz J.D., Ralser M. (2015) The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 90:927-963. DOI: 10.1111/brv.12140.
- Stirban A., Negrean M., Stratmann B., Gawlowski T., Horstmann T., Götting C., Kleesiek K., Mueller-Roesel M., Koschinsky T., Uribarri J., Vlassara H., Tschoepe D. (2006) Benfotiamine prevents macro- and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 29:2064-71. DOI: 10.2337/dc06-0531.
- Stummer I. (2020) Agrárpiaei Jelentések. NAIK Agrárgazdasági Kutatóintézet.
- Sukriti S., Tauseef M., Yazbeck P., Mehta D. (2014) Mechanisms regulating endothelial permeability. *Pulmonary Circulation* 4:535-551. DOI: 10.1086/677356.
- Sung J., Yang J., Kim Y., Kim M., Jeong H.S., Lee J. (2016) Effect of defatted pepper (*Capsicum annuum* L.) seed extracts on high-fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *Food Science and Biotechnology* 25:1457-1461. DOI: 10.1007/s10068-016-0226-0.
- Tag H.M., Kelany O.E., Tantawy H.M., Fahmy A.A. (2014) Potential anti-inflammatory effect of lemon and hot pepper extracts on adjuvant-induced arthritis in mice. *The Journal of Basic & Applied Zoology* 67:149-157. DOI: 10.1016/j.jobaz.2014.01.003.
- Talwar D., Davidson H., Cooney J., St J.R.D. (2000) Vitamin B₁ status assessed by direct measurement of thiamin pyrophosphate in erythrocytes or whole blood by HPLC: comparison with erythrocyte transketolase activation assay. *Clinical Chemistry* 46:704-10.
- Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. (2014) IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6:a016295-a016295. DOI: 10.1101/cshperspect.a016295.
- Tanaka T., Yamamoto D., Sato T., Tanaka S., Usui K., Manabe M., Aoki Y., Iwashima Y., Saito Y., Mino Y., Deguchi H. (2011) Adenosine thiamine triphosphate (AThTP) inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) activity. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)* 57:192-6. DOI: 10.3177/jnsv.57.192.

- Trepels T., Zeiher A.M., Fichtlscherer S. (2006) The endothelium and inflammation. *Endothelium* 13:423-9. DOI: 10.1080/10623320601061862.
- Tylicki A., Łotowski Z., Siemieniuk M., Ratkiewicz A. (2018) Thiamine and selected thiamine antivitamin - biological activity and methods of synthesis. *Bioscience Reports* 38:BSR20171148. DOI: 10.1042/BSR20171148.
- Ullah R., Khan M., Shah S.A., Saeed K., Kim M.O. (2019) Natural antioxidant anthocyanins-a hidden therapeutic candidate in metabolic disorders with major focus in neurodegeneration. *Nutrients* 11:1195. DOI: 10.3390/nu11061195.
- Verhamme P., Hoylaerts M.F. (2006) The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clinica Belgica* 61:213-9. DOI: 10.1179/acb.2006.036.
- Volvert M.-L., Seyen S., Piette M., Evrard B., Gangolf M., Plumier J.-C., Bettendorff L. (2008) Benfotiamine, a synthetic S-acyl thiamine derivative, has different mechanisms of action and a different pharmacological profile than lipid-soluble thiamine disulfide derivatives. *BMC Pharmacology* 8:10-10. DOI: 10.1186/1471-2210-8-10.
- Walinsky P., Smith J.B., Lefer A.M., Lebenthal M., Urban P., Greenspon A., Goldberg S. (1984) Thromboxane A2 in acute myocardial infarction. *American Heart Journal* 108:868-72. DOI: 10.1016/0002-8703(84)90447-2.
- Wallace T.C. (2011) Anthocyanins in cardiovascular disease. *Advances in Nutrition* 2:1-7. DOI: 10.3945/an.110.000042.
- Wallace T.C., Giusti M.M. (2015) Anthocyanins. *Advances in Nutrition* 6:620-622. DOI: 10.3945/an.115.009233.
- Wang T., Fu X., Chen Q., Patra J.K., Wang D., Wang Z., Gai Z. (2019) Arachidonic acid metabolism and kidney inflammation. *International Journal of Molecular Sciences* 20:3683. DOI: 10.3390/ijms20153683.
- Wierzbicki A.S., Lloyd M.D., Schofield C.J., Feher M.D., Gibberd F.B. (2002) Refsum's disease: a peroxisomal disorder affecting phytanic acid alpha-oxidation. *Journal of Neurochemistry* 80:727-35. DOI: 10.1046/j.0022-3042.2002.00766.x.
- Winkel-Shirley B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126:485-493. DOI: 10.1104/pp.126.2.485.
- Winter A.N., Bickford P.C. (2019) Anthocyanins and their metabolites as therapeutic agents for neurodegenerative disease. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 8:333. DOI: 10.3390/antiox8090333.
- Wu T., Gao Y., Guo X., Zhang M., Gong L. (2018) Blackberry and blueberry anthocyanin supplementation counteract high-fat-diet-induced obesity by alleviating oxidative stress and inflammation and accelerating energy expenditure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018:4051232. DOI: 10.1155/2018/4051232.
- Xie L., Su H., Sun C., Zheng X., Chen W. (2018) Recent advances in understanding the anti-obesity activity of anthocyanins and their biosynthesis in microorganisms. *Trends in Food Science & Technology* 72:13-24. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.12.002.
- Yadav U.C., Subramanyam S., Ramana K.V. (2009) Prevention of endotoxin-induced uveitis in rats by benfotiamine, a lipophilic analogue of vitamin B₁. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50:2276-82. DOI: 10.1167/iops.08-2816.
- Yamashita H., Zhang Y.X., Nakamura S. (1993) The effects of thiamin and its phosphate esters on dopamine release in the rat striatum. *Neuroscience Letters* 158:229-31. DOI: 10.1016/0304-3940(93)90271-1.
- Yan L.J. (2018) Redox imbalance stress in diabetes mellitus: role of the polyol pathway. *Animal Models and Experimental Medicine* 1:7-13. DOI: 10.1002/ame2.12001.

- Yang Y., Shi Z., Reheman A., Jin W., Li C., Zhu G., Wang Y., Freedman J.J., Ling W., Ni H. (2010) Anthocyanins inhibit platelet activation and attenuate thrombus growth in both human and murine thrombosis models. *Blood* 116:3197-3197. DOI: 10.1182/blood.V116.21.3197.3197.
- Zákány N., Oláh A., Markovics A., Takács E., Aranyász A., Nicolussi S., Piscitelli F., Allarà M., Pór Á., Kovács I., Zouboulis C.C., Gertsch J., Di Marzo V., Bíró T., Szabó T. (2018) Endocannabinoid tone regulates human sebocyte biology. *Journal of Investigative Dermatology* 138:1699-1706. DOI: 10.1016/j.jid.2018.02.022.
- Zhao Y., Pan X., Zhao J., Wang Y., Peng Y., Zhong C. (2009) Decreased transketolase activity contributes to impaired hippocampal neurogenesis induced by thiamine deficiency. *Journal of Neurochemistry* 111:537-46. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06341.x.
- Zhao Z. (2019) Iron and oxidizing species in oxidative stress and Alzheimer's disease. *Aging Medicine (Milton (N.S.W))* 2:82-87. DOI: 10.1002/agm2.12074.

12. Publikációk az értekezés témakörében



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/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., Szöllősi, 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 zsirtartalmára és zsírsavösszetételére = Effect of fertilization on the fat content and fatty acid profile of sorghum flour samples.
Élelmvizsg. 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., 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: 3.06

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,695

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján 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.



13. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Remenyik Judit tudományos főmunkatársnak szeretnék köszönetet mondani, aki biztosította a kísérleteimhez szükséges szellemi és anyagi feltételeket. Köszönet illeti közvetlen hozzáállásáért és belém vetett bizalmáért, ami kulcsfontosságú volt az évek során. Köszönöm, hogy a tudomány olykor rögös, de mindig izgalmas útján elindított.

Köszönöm Dr. Stündl Lászlónak, az DE-MÉK Élelmiszertechnológiai Intézet vezetőjének, hogy helyet biztosított kísérleteim megvalósításához.

Köszönöm Dr. Gyémánt Gyöngyi egyetemi docensnek, hogy sokszor kritikus, de tanulságos és hasznos tanácsaival és a műszeres analitikai vizsgálatok során nyújtott segítségével hozzájárult a disszertációm elkészítéséhez.

Köszönöm Dr. Markovics Arnoldnak a kísérletekben nyújtott önzetlen segítségét, a sejttenyézzettel kapcsolatos munka során a tőle tanultakat. A közös ötletelések mindig inspirálóan hatottak rám. Köszönöm Biróné Molnár Piroskának az ELISA mérések során tanúsított készséges hozzáállását. Külön köszönet illeti munkacsoportunk minden tagját, akik áldozatkész hozzáállásukkal támogattak tudományos munkám sikeres kivitelezésében: Szöllősi Erzsébet, Kun-Nemes Andrea, Dr. Homoki Judit Rita, Pest-Asbóth Georgina, Szarvas Mária Magdolna, Dr. Fazekas Mónika Éva, Szabó Szabolcs, Szilágyi Endre. Izgalmas intellektuális tapasztalás volt a közös munka.

Köszönöm Dr. Cziáky Zoltánnak, Dr. Bacsó Zsoltnak, Prof. Dr. Batta Gyulának, Dr. Hegedűs Csabának és Dr. Tarapcsák Szabolcsnak, hogy szakértelmükkel hozzájárultak kísérleteim elegánsabb és igényesebb interpretációjához. Köszönöm Dr. Lukács Jánosnak, hogy biztosította a kísérleteimhez nélkülözhetetlen köldökzsinórokat.

Hálás vagyok barátaimnak biztatásukért, támogatásukért és a mindig kiváló humorérzékükért.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani családomnak. Hálával tartozom édesanyámnak, aki szeretetével és áldozatos munka árán mindig támogatta terveim megvalósítását. Köszönöm testvérem, Dr. Biró Ádám kutatásaimmal kapcsolatos rendkívül hasznos javaslatait és magánéleti tanításait. Bízom benne, hogy ragadt rám az őt mindig jellemző szakmai igényességből. Elmondhatatlanul hálás vagyok feleségemnek, hogy türelmével, gondviselő szeretetével mindvégig és töretlenül támogatott céljaim elérésében.

14. Nyilatkozat

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

.....

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Biró Attila doktorjelölt 2014-2021 között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javaslom.

.....

a témavezető aláírása