

MTA Doktora Pályázat

Doktori Értekezés

**A redox–homeosztázis változása és az antioxidánsok jelentősége
máj- és bélbetegségekben**

Dr. Blázovics Anna

Budapest, 2005

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	5
1. BEVEZETÉS ÉS A TÉMA INDOKLÁSA	9
2. IRODALMI HÁTTÉR	14
2.1. A redox-homeosztázis sejtszintű alapjai	14
2.1.1. Az arachidonsavkaskád vegyületei, a szabad gyökök és az immunrendszer aktiválódása	14
2.1.2. Citokinek a gyulladásos folyamatok mediátorai	19
2.1.3. Transzkripciós faktorok	22
2.1.4. Szabad gyökök szerepe a szignáltranszdukcióban	23
2.1.5. Fémionok és szignáltranszdukció	24
2.2. Lipidanyagcsere, citokinek	25
2.3. A nem alkoholos eredetű zsírmáj és steatohepatitis kapcsolata a szabadgyökös reakciókkal	27
2.4. Az alkoholos zsírmáj kialakulása és a szabadgyökös reakciók szerepe az alkohol metabolizmusában	29
2.4.1. Az alkohollebontás biokémiája	30
2.4.2. A mikroszomális alkohol- és acetaldehidmetabolizmus	32
2.4.3. Redox-homeosztázis alkoholizmusban	33
2.4.4. Citokinek szerepe alkoholos májbetegségben	36
2.5. Szabad gyökök és epekőbetegségek	36
2.6. Redox-homeosztázis gyulladásos bélbetegségeken	39
2.6.1. Szabad gyökök szerepe IBD-ben	39
2.6.2. A redox-homeosztázist befolyásoló fémionok koncentrációviszonyai IBD-ben	41
2.6.3. IBD és a colorectalis rák	42
2.7. Nem nutritív táplálkozási faktorok	43
2.7.1. Antioxidáns vitaminok	45
2.7.2. Polifenolok, flavonoidok	52
2.7.3. Antioxidánsok hatása a prosztanoidok és citokinek képződésére	58
3. MÓDSZEREK ÉS ANYAGOK	60
3.1. Állatkísérletek	60
3.1.1. Alimentáris hyperlipidaemia-modell patkányokon	60
3.1.2. Kísérletek húscsirkékkel	60
3.2. Állatműtétek	60
3.2.1. Ductus choledochus kanülálása patkányokban	61
3.2.2. Partialis hepatectomia patkányokban	61
3.3. Szövetpreparátumok készítése	61
3.3.1. Májhomogenizátum készítése	61
3.3.2. Mikroszóma izolálása májból	61
3.3.3. Bélmucosa-homogenizátum készítése	61
3.4. Enzimaktivitás- és metabolitkoncentráció-meghatározások	62
3.4.1. Enzimaktivitás és metabolitkoncentráció-meghatározások vérből	62
3.4.2. Enzimtartalom- és enzimaktivitás-meghatározások májból	62
3.5. Redoxi-paraméterek meghatározása különböző szövetekből	63
3.5.1. Redukálóképesség meghatározása	63
3.5.2. H-donor-aktivitás meghatározása	63
3.5.3. Össz-scavenger kapacitás meghatározására	64

3.5.4.	Totál antioxidáns státusz	64
3.6.	Lipidperoxidációs paraméterek meghatározása	65
3.6.1.	Diénkonjugátum-koncentráció meghatározása májból	65
3.6.2.	Diénkonjugátum-koncentráció meghatározása epéből	65
3.6.3.	Malondialdahid-koncentráció meghatározása	65
3.6.4.	Szabad szulhidrilcsoportok meghatározása	65
3.6.5.	Oxidált lipidek kimutatása	65
3.7.	Fémionanalízis	66
3.7.1.	Mintaelőkészítés	66
3.7.2.	Mérés ICP-OES-rel	66
3.8.	Egyéb biokémiai és immunológiai módszerek	66
3.8.1.	Limfocitaproliferáció	66
3.8.2.	Lépsejt-preparálás	67
3.8.3.	IL-1- és TNF- α -release kiváltása	67
3.8.4.	IL-1-aktivitás meghatározása	67
3.8.5.	TNF- α -citotoxicitás meghatározása	67
3.8.6.	Citokinek meghatározása kitekkel	68
3.8.7.	Tumormarkerek meghatározása kitekkel	68
3.8.8.	Glutation-peroxidáz meghatározása kittel	69
3.8.9.	Szuperoxid-dizmutáz meghatározása kittel	69
3.8.10.	Epesavak meghatározása enzimatisz kolorimetriás kittel	69
3.8.11.	Vörösvértest-hemolizátum hemoglobintartalmának meghatározása	69
3.8.12.	Biológiai minták fehérjetartalmának meghatározása	69
3.9.	Fitokémiai analízisek	69
3.9.1.	Spektrofotometriás meghatározások	69
3.9.2.	Kromatográfiás vizsgálatok	71
3.9.3.	Luminometriás vizsgálatok növényi eredetű készítmények scavenger tulajdonságának meghatározására	71
3.10.	Zsírösszetétel meghatározása	72
3.10.1.	Májminták vizsgálati körülményei	72
3.10.2.	Epeminták vizsgálati körülményei	72
3.11.	Minták A- és E-vitamintartalmának meghatározása	73
3.12.	Szabad bilirubin és bilirubinszármazékok kimutatása epéből	73
3.13.	Co⁶⁰ γ – besugárzás	73
3.14.	ESR-vizsgálatok	73
3.15.	Anyagok	73
3.16.	Statisztikai analízis	74
4.	EREDMÉNYEK	75
4.1.	Természetes eredetű hatóanyagok in vitro tanulmányozása	75
4.1.1.	Sempervivum tectorum	75
4.1.2.	Beiqishen tea	80
4.2.	Antioxidáns terápia jelentősége a redox-homeosztázis változására állatkísérletes modellekben	87
4.2.1.	Antioxidánsok hatása alimentáris eredetű zsírmájban	87
4.2.1.1.	Szabadgyökös károsodások és antioxidáns védelem igazolása zsírmájban	89
4.2.1.2.	Antioxidáns-terápia hatása a MFO-rendszerre zsírmájban	93
4.2.1.3.	Antioxidánsok hatása az immunfolyamatokra	96
4.2.2.	Antioxidánsok hatása a máj regenerációjában partialis hepatectomia-modellben	100
4.2.3.	Antioxidánsok hatása a bél redox-homeosztázisára	106
4.3.	Szabadgyök-reakciók máj- és hólyagepében állatkísérletekben és humán tanulmányokban	110

4.3.1.	Lipidperoxidáció a máj- és hólyagepében	111
4.3.2.	A bilirubin ambivalens viselkedése	115
4.4.	Tesztrendszer kidolgozása a redox-homeosztázis tanulmányozására különböző betegségekben	120
4.4.1.	Vizsgálatok gyulladásos bélbetegségekben	123
4.4.2.	Raphacol-kezelés hatása gyulladásos bélbetegségekben	128
4.4.3.	Vizsgálatok tumoros betegekben	135
4.4.4.	Vizsgálatok májbetegségekben	142
4.5.	Az esszenciális és toxikus fémionok biokémiai reakciói	147
4.5.1.	Toxikus fémionterhelés hatása a májszövet és az epe lipidperoxidációs paramétereire	148
4.5.2.	Toxikus elemek dúsulása zsírmájban, patkányokban	152
4.5.3.	A Beiqishen tea fémiontartalmának hatása normo- és hyperlipidaemiás patkányok fémionháztartására	156
4.5.4.	A Zn-túladagolás hatása a vasanyagcserére gyulladásos bélbetegségekben	162
5.	ÖSSZEFOGLALÁS	167
5.1.	In vitro vizsgálatok	169
5.2.	In vivo állatkísérletek	171
5.3.	Humán tanulmányok	174
6.	MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS GYAKORLATI HASZNOSÍTÁS	176
7.	IRODALOMJEGYZÉK	178
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	217
	1. Melléklet	

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

Abs = abszorbanca
 ACAT = acil-CoA - koleszterin-aciltranszferáz
 ADH = alkohol-dehidrogenáz
 AFP = alfa foetoprotein
 ALDH = aldehyd-dehidrogenáz
 ALP = alkalikus-foszfátáz
 AMY = amiláz
 ANA = antinukleáris antitest
 AP-1 = aktivátor protein-1
 Apaf-1 = apoptotikus proteáz-aktiváló faktor-1
 ApoRBP = apo-retinolkötő-protein (apo-retinol-binding protein)
 ARAT = acil-CoA-retinol-aciltranszferáz
 ASK-1 = apoptózis szignálregulátor-kináz
 ATF = aktiváló transzkripció faktor
 BCL2 = antiapoptotikus fehérje
 bcl2 = onkogén
 BAX = apoptózist segítő fehérje
 bax = BAX fehérjét termelő gén
 BUN = karbamid (blood urea nitrogén)
 C = komplement faktor
 cAMP = adenzin-3',5'-ciklikus monofoszfát
 CAT = kataláz
 CA-19-9 = tumormarker
 C(C3) = komplement faktor
 CD = Crohn-betegség
 CD3 = antigén
 CEA = carcinoembrionalis antigén
 CHOL = koleszterin
 9-cisz-RCOOH = 9-cisz retinsav
 cGMP = guanozin-3',5'-ciklikus monofoszfát
 CoA = koenzim A
 COX1 = konstitutív ciklooxygenáz 1 enzim
 COX2 = indukálható ciklooxygenáz 2 enzim
 COX3 = ciklooxygenáz 3 enzim
 cpm = beütésszám/perc (count per minute)
 CSF = kolóniastimuláló faktor
 CU = colitis ulcerosa
 CRABP(I,II) = retinsavkötő-protein (cellular retinoic acid-binding protein) (I,II)
 CRBP(I,II) = retinolkötő-protein (cellular retinol-binding protein) (I,II),
 CREA = kreatin
 Creb = transzkripció faktor
 DCT1 = kétértékűfém-transzporter (divalent cation transporter)
 DGLA = dihomogammalinolénsav
 DHA = dokozahexaénsav
 DNS = dezoxiribonukleinsav
 DPPH = 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
 EDTA = etilén-diamin-tetraecetsav
 EFA = esszenciális zsírsavak (essential fatty acids)

EGR = transzkripciós factor
 ELISA = enzimhez kötött immunoszorbens-assay
 EPA = eikozapentaénsav
 EPO = eritropoetin
 ERK1/2 = szignálregulált kináz 1/2
 ESR = elektronspin-rezonancia
 Fab' = immunglobulin fragmentum
 GC = gázkromatográfia
 GC/MS = gázkromatográfia/tömegspektrográfia
 γ GT (GGT) = γ -glutaminsav-transzamináz
 GDP = guanozin-difoszfát
 GLA = γ -linolénsav
 GLUC = glükóz
 GLUT = glükóztaszporter
 GM-CSF = granulocita-makrofág-koloniastimuláló faktor
 GMP = guanozin-monofoszfát
 GOT = glutamin-oxálecetsav-transzamináz (AST)
 GPT = glutamin-piroszőlősav-transzamináz (ALT)
 Grx(ox) = oxidált glutaredoxin
 Grx(red) = redukált glutaredoxin
 GSH = redukált glutation
 GSHPx = glutation-peroxidáz
 GSSG = oxidált glutation
 GST = glutation-S-transzferáz
 HbA_{1c} = oxidált hemoglobin
 HDL = nagy fajsúlyú lipoprotein (high density lipoprotein)
 HIF1 α = hipoxia-indukált factor
 HLA = hisztokompatibilitási rendszer
 HMG-Co-A reduktáz = 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim-A reduktáz
 hMHT = MutT-enzim humán-homológ
 hMLH1 = DNS mismatch repair gén
 HNF-1 = hepatikus nukleáris faktor-1
 hOgg1 = humán 8-oxoguanin-glikoziláz
 HPLC = nagyhatékonyságú folyadékkromatográf
 IBD = gyulladásos bélbetegség (inflammatory bowel disease)
 IFN- β , γ = interferonok
 Ig A, $\sim$ E, $\sim$ G, $\sim$ M = immunglobulinok
 ICP-OES = induktív gerjesztésű plazma emissziós spektrométer
 IGF-1 = inzulinszerű növekedési factor (insulin like growth factor)
 IKEB = Intézeti Kutatásetikai Bizottság
 IKK = I κ B-kináz
 IL-(1-12) = interleukinek (1-12)
 IR = impulzus-radiolízis
 IRE = vas-érzékeny elemek (iron responsive elements)
 IRP-1,-2 = vasregulátor fehérje (iron regulatory protein-1,2)
 JNK/SAPK = c-Jun N-terminális kinázok
 L $\cdot$ = alkilgyök
 LDL = alacsony fajsúlyú lipoprotein (low density lipoprotein)
 LO $\cdot$ = alkoxigyök
 LOO $\cdot$ = lipid-hidroperoxidgyök
 LOOH = lipid-hidroperoxid
 LPS = lipopoliszacharid

LRAT = lecitin-retinol-aciltranszferáz
 MAPK = mitogénaktivált proteinkinázok
 MCSF = monocyta kolóniasztimuláló faktor (monocyte colony stimulating factor)
 MDA = malondialdehid
 MDM2 = sejtmag- és membránköti fehérje
 MEKK-1 = mitogénaktivált proteinkináz-kináz-1
 MEOS = mikroszomális etanoloxidáló rendszer
 MIF = gyulladási faktor
 MUFA = telítetlen zsírsavak (monounsaturated fatty acid)
 NAD⁺ = nikotinamid-adenin-dinukleotid oxidált forma
 NADH = nikotinamid-adenin-dinukleotid redukált forma
 NADP⁺ = nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát oxidált forma
 NADPH = nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált forma
 NER = nukleotid kivágó javítás
 NF-κB = nukleáris faktor
 NIK = NF-κB-indukáló kináz
 NIST = Nutritional Institute of Standards and Technology
 NK-sejtek = természetes ölő sejt (natural killer cell)
 NSAID = nem szteroid gyulladásgátló
¹O₂ = szinglet oxigén
 O⁻² = szuperoxid anion
 ·OH = hidroxilgyökök
 OTC = recept nélkül kapható (over the counter)
 OxyR = transzkripciós faktor
 p53 = transzkripciós faktor
 p65 = transzkripciós faktor alegység
 PAF = trombocita aktiváló faktor
 PGF = növekedési faktor (platelet derived growth factor)
 PDGF = trombocita eredetű növekedési faktor (platelet derived growth factor)
 PDI = protein-diszulfid-izomeráz
 PG = prosztaglandin
 PGE₂ = prosztaglandinszármazék
 PGI₂ = prosztaciklin
 15d-PGJ₂ = 15-deoxi-Δ^{12,14}-PGJ₂
 PPAR = peroxiszóma-proliferátor aktivált receptor (peroxisome proliferator activated receptor)
 PUFA = többszörösen telítetlen zsírsav (polyunsaturated fatty acid)
 RADH = retinal-dehidrogenáz
 RAR = (alfa, béta, gamma) retinoid-receptorcsalád
 RARE = retinoid-receptorok által szabályozott gén funkcionális egység,
 RBP-receptor = retinolkötő-proteinreceptor (retinol-binding protein receptor)
 RCHO = retinal
 RCOOH = retinsav
 Ref-1 = redoxfaktor-1
 REH = retinilészter-hidroláz
 R-FA = retinil - észter
 RLU = kemilumineszcenciás fényintenzitás (relative light unit)
 rpm = percenkénti fordulatszám
 RO₂ = szerves alkilgyökök
 RODH = retinol-dehidrogenáz
 ROH = szerves alkohol
 ROS = reaktív oxigén speciesz
 RR = ribonukleotid-reduktáz

RXR = (alfa, béta, gamma) retinoid-receptorcsalád
 RXRE = retinoid-receptorok által szabályozott gén funkcionális egység
 SFRR = Society of Free Radical Research
 SH-csoport = szabad szulfhidrilcsoport
 SOD = szuperoxid-dizmutáz
 SOD-like aktivitás = szuperoxid-dizmutázhoz hasonló gyökbefogó aktivitás
 SUMO = small ubiquitin like modifier
 TAS = totál antioxidáns státusz
 TBAR = tiobarbitursav
 TBARS = tiobarbitursav reaktív anyagok
 TBIL = össz-bilirubin
 TCA = triklórecetsav
 TCR = transzkripció
 TG = triglicerid
 TGF β = növekedési faktor (transforming growth factor β)
 TGF-1 β = növekedési faktor - 1 β
 T_H-1,2 = aktivált T-sejtek (helper)
 TIC = total ion current (chromatogram)
 TNF- α = tumornekrozis faktor- α
 TR = tioredoxin-reduktáz
 Trx(ox) = oxidált tioredoxin
 Trx(red) = redukált tioredoxin
 TSC = össz-scavenger kapacitás (total scavenger capacity)
 TTR = transztiretin
 TUKEB = Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
 TXA₂ = tromboxán A₂
 UA = húgysav (uric acid)
 UDP = uridin-difoszfát
 UGT = uridin-difoszfát-glükuronil-transzferáz
 UV = ultraibolya fény
 v-Ets = transzkripció faktor
 XBP-1 = Xho-1 hely-kötő protein
 XO = xantonoxidáz
 8-oxodG = 8-oxo-2'-deoxiguanozin
 8-oxoG = 8-oxo-guanozin

Statisztikai rövidítések:

cv = variációs koefficiens
 h₁;h₂ = konfidenciahatárok
 n.sz. = nem szignifikáns
 SEM = standard hiba (standard error of the mean)
 SD = standard deviáció
 sz. = szignifikáns

Az értekezésben előforduló egyéb rövidítések magyarázatai a szövegben találhatók. A dolgozat elkészítéséhez az „Orvosi Helyesírási Szótár” (Akadémiai Kiadó, Budapest, 1992.), „A magyar helyesírás szabályai” (Akadémiai Kiadó, Budapest, 1994.), „Immunológia Szótár” (Medicina, Budapest, 2000.) és az „Útmutató a szerves vegyületek IUPAC-nevezéktanához” (Magyar Kémikusok Egyesülete, Budapest, 1998.) könyvek ajánlásait tekintetem mérvadónak.

1. BEVEZETÉS ÉS A TÉMA INDOKLÁSA

A szabad gyökök élettani, kórélettani szerepének felismerése hosszú és szerteágazó kutatások eredménye. Olyan jelentős felismerések előzték meg, mint például a Nobel-díjas Szent-Györgyi Albert megállapításai az élő állapot paramágneses tulajdonságáról, vagy Coman rákos szövetekben végzett tanulmányai a sejteket összetartó laza erők és a kismértékű elektrontelítetlenség közötti kapcsolatok feltárásáról (Szent-Györgyi 1941, Coman 1944). Pohl és munkatársai harminc évvel később igazolták, hogy az élő szövetek ESR szignáljáért főképpen a sejtalkotórészek fehérjeinek szabadgyök-jellege felelős (Pohl 1977).

Később a szuperoxid-dizmutáz felfedezésével és funkciójának tisztázásával egy másik irányból kezdtek el közelíteni a biológiai rendszerekben végbemenő szabadgyök-reakciók megértéséhez. McCord és Fridovich első közleményei 1968 és 1976 között jelentek meg (McCord 1969, Fridovich 1984). A hetvenes évek nagy eredményeihez tartozott a prosztaglandinok izolálása, majd szintézise, mely újabb lendületet adott azoknak a kutatásoknak, amelyek már a szabad gyökök funkciójának megismerését biztosították. Az alapkutatások Vane, Samuelsson, Bergstöm nevéhez fűződtek, akiket 1982-ben Nobel-díjjal jutalmaztak. A NO molekula, mint az élő szervezetben keletkező szabad gyök, már elképesztő távlatokat nyitott meg a további kutatásokhoz, ennek bizonyítéka, hogy a NO 1992-ben az „év molekulája” lett. A kutatásokért Furchgott, Ignarro és Murad 1998-ban Nobel-díjat kapott (Ignarro 1990, Dézsi 2001).

Különösen nagy jelentősége volt annak a felismerésnek is, hogy a szabad gyökök és antioxidánsok egyensúlya meghatározó a szöveti működés szempontjából, mivel az oxidatív stressz és az antioxidáns védekező mechanizmus egyaránt alapvető szerepet játszik az életfolyamatokban. Az oxidatív stressz pleiotrop modulátornak tekinthető, mert számos extracelluláris és intracelluláris folyamatot vált ki, így részt vesz a ligand-receptor kölcsönhatásokban, szekunder messengerként hat számos szignáltranszdukciós molekulára a kemotaktikus citokinek és a sejtfelszíni adhézis fehérjék aktiválásakor. Ma már bizonyított, hogy a sejtciklus szabályozása függ az intracelluláris redoxi-állapottól, mert a meghatározó lépések érzékenyen reagálnak az oxidatív stresszre és az antioxidánsokra egyaránt. A DNS-szintézis, a szelektív génkifejeződés, az enzimaktiválások és a sejtproliferáció szabályozása egyaránt érintett a redoxi-szignálreakciókban.

Szent-Györgyi szerint a metil-glioxál és a glutation-SH antagonizmusa az élet hajtóereje. A sejtosztódás nem képzelhető el az SH-csoport reakciói, és annak redoxipotenciálja nélkül. A metil-glioxál szerepét az élő szervezetben azzal magyarázzák, hogy a fehérjéktől elektronokat von el, így ezeket a molekulákat félvezetőkké alakítja, „gyökösíti”, élőkké alakítja. A metil-

glioxál a fehérje akceptor szennyeződése, mely az -NH_2 és -SH csoportokhoz képes kötődni. A metil-glioxál fékezi a sejtosztódást (Brillouin 1962, Szent-Györgyi 1977).

A szaporodás szempontjából fontos az A-vitamin, amely egy többszörösen telítetlen poliizoprenoid-származék. Rendkívül jó gyökcsapda, mely magreceptorokon fejti ki hatását. Vélhetően antioxidáns tulajdonsága fontos a DNS-replikáció során.

Az utóbbi évek kutatásai egyértelműen igazolták, hogy a kontroll alól felszabaduló oxigén szabad gyökök koncentrációtól függően hozzájárulnak a sejtek életfunkcióinak szétzilálásához, ezáltal kiváltják a sejtek apoptotikus vagy nekrotikus pusztulását. Tehát bizonyítást nyert, hogy a szervezetben oxidatív károsodott molekulák bonyolult biokémia folyamatok eredményei.

Azt mondhatjuk, hogy az 1970-es évektől egyre nagyobb érdeklődés mutatkozott az élő szervezetekben lejátszódó szabadgyök-típusú reakciók megismerésére. Ennek ékes bizonyítéka, hogy a „free radical” és „antioxidant” kulcsszavak alatt keresett szakirodalmak száma az elmúlt tíz évben megsokszorozódott, számuk a MEDLINE szerint 18602, ill. 28223 volt 2003 augusztusáig.

Annak ellenére, hogy e területen évről évre egyre több információhoz jutunk, még mindig vannak jelentős fehér foltok. Ilyen területek például a táplálékkal felvett természetes antioxidánsok sorsa a szervezetben, vagy a vörösvértestek redox-homeosztázisának változása a máj és a bél betegségeiben, a tumoros folyamatokban, de keveset tudunk a fémionok redox-homeosztázisban betöltött élettani, valamint patológiás hatásairól is, pedig számos képviselőjük mind az oxidatív folyamatok, mind az antioxidáns védelmi mechanizmusok kulcsfontosságú szereplője. Ezért az e területeken végzett kutatási eredményeinket foglalom össze jelen dolgozatomban.

1979-ben, a doktori fokozat megszerzésének keretén belül kezdtem el foglalkozni a szabad gyökök kutatásával a különböző biológiai rendszerekben (Blázovics, Egyetemi doktori értekezés, 1983), 1983-ban meghatározó előrelépést jelentett a szabadgyök-kutatás folytatása különös tekintettel a májbetegségek patomechanizmusára. Már az első években jelentős eredményeket értünk el a szintetikus antioxidánsok (CH 402, MTDQ-DS), illetve a *Silibum marianumból* készült silibinin és az akkor „üstökösként berobbanó”, majd toxicitása miatt forgalomból rövidesen kivont (+)-cianidanol-3 (catechol típusú) hatóanyagok hatásmechanizmusának és hatásspektrumának meghatározásával különböző szöveti preparátumokon és kísérletes hyperlipidaemiában (Gerő 1985, Fehér 1985a,b, Blázovics 1986, 1988a,b,c, 1989, 1989a,b, Fehér 1989). Már a korai kutatások során is felismertük, hogy bizonyos antioxidánsok, mint például a (+)-cianidanol-3 antioxidáns tulajdonsága mellett nagyobb koncentrációkban képes a Mg^{++} -ATP-áz és a $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATP-áz gátlására, ezért a kezelések során erre a lényeges hatásra is fel kellett hívni a figyelmet (Blázovics 1986). E munkák eredményeként 1989-ben megszereztem

a kandidátusi fokozatomat. 1990-től újabb kísérletes modelleket fejlesztettünk ki a természetes antioxidánsok (E-vitamin, silibinin és több gyógynövénykivonat) jelentőségének tanulmányozására a májbetegségek primer és szekunder prevenciójában. Partialis hepatectomiát és ductus coledochus ligaturát végeztünk (Horváth 1993) az alimentáris eredetű zsírmáj-modell mellett patkányokban. E vegyületek hatásmechanizmusának jobb megismerésére tanulmányoztuk az antioxidáns tulajdonság következményeit, ill. a vegyületek nem, vagy nemcsak antioxidáns molekulaszervezetével magyarázható egyéb élettani hatásait, valamint kölcsönhatásukat az együttes terápiás alkalmazás során. Az elemzésekhez analitikai, biokémiai, immunológiai és morfológiai vizsgálatokat végeztünk (Vereckei 1991, Gonzalez-Cabello 1992/1993, Blázovics 1992, 1993, 1994, Fehér 1996).

1993-tól ETT és OTKA támogatással, valamint a 7. Ph.D. Program keretén belül folytattunk kutatásokat a gyógy- és fűszernövények, majd később a gyümölcsök és zöldségfélék részletesebb szabadgyök-fogó és lipidperoxidációt gátló tulajdonságának meghatározására. Különösen a növények fenolos komponensei keltették fel érdeklődésünket. E kutatások célja az volt, hogy feltárjuk a táplálkozással szervezetünkbe jutó hatóanyagok közvetlen, ill. közvetett hatásait (Blázovics 1996, 1996b, 1997, Fehér 1997a,b). A kutatások a Semmelweis Egyetem Gyógynövény és Drogismereti Intézetével közösen folytak (Fejes 2000, Czinner 2003, Apáti, 2004). Ezekre a kísérletekre azért volt szükség, mert egyre gyakrabban lehetett olvasni olyan tudományos közleményeket, melyek az antioxidánsok prooxidáns tulajdonságát bizonyították, illetve máj- és vesekárosodásokról számoltak be egyes fogyasztó kínai teák kúraszerű alkalmazásakor. Az antioxidáns vitaminok közül az A-vitamin teratogén, tumorogén hatására vonatkozó adatok is napvilágot láttak (Gartner 1993, Jadoul 1993, Vanherweghen 1993, Peterson 1996, Blázovics, 1996, Paolini 1999, Hagymási 2004).

1992. és 2000. között tanulmányoztuk annak lehetőségét is, hogy az antioxidánsok együttes adása különböző hatóanyagokkal, mint például az amiodaronnal, jelenthet-e új lehetőséget az amiodaron toxicitásának kivédésére, és a gyógyszerforma antiarrhythmyás hatásának esetleges fokozására (Vereckei 1991, 1992, 1993, 1994, Ágoston 2001, 2003). Ebben az időszakban kezdtünk el foglalkozni a szabadgyök-reakciók szerepének kutatásával az epekövetegségek patomechanizmusában, majd 2000-től a nem nutritív táplálkozási faktorok jelentőségét tanulmányoztuk a máj- és bélbetegségek gyógyításában, emberben (Blázovics 1994, 1995, 1996, 1996a, 1997, 1998, Abdel Rahman 1995, Sípos 1997, 2001a). Emberekkel végzett vizsgálatainkban a Raphacol epegranulátum hatására voltunk kíváncsiak diabeteses betegek és gyulladásos bélbetegségekben szenvedőknél (Lugasi 2001, 2001a,b, Kovács 2001, Blázovics 2004f). E szerteágazó kutatási projektek egzakt módszereket kívántak. Kutatólaboratóriumunk olyan vizsgálati repertoárt fejlesztett ki az évek során, amely lehetővé tette a gyors, pontos és

eredményes kutatásokat, mind in vitro, mind in vivo körülmények között (György 1992, Prónai 1993, Blázovics 1994 a,b, Blázovics 1999, 1999a). A kutatási protokollt a Sempervivum tectorum-kivonat tanulmányozásán keresztül ismertetem.

A 2001-ben elnyert Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Programok keretén belül további lehetőség nyílt korszerű módszerek kidolgozására a szervezet redox-homeosztázisának meghatározására egészséges és beteg populációban. Kísérletet tettünk az antioxidáns státusz normálértékének meghatározására, ill. az intestinális tumorok kiszűrésére (Blázovics 2000, Szilvás 2001, 2001a, Hagymási 2001, 2002). Ugyancsak fontos előrelépést jelentett a módszerfejlesztés a fémkomplexek élettani hatásának vizsgálatára (Szentmihályi 2000, 2000 a,b, Blázovics 2002, 2003, 2003a,b). E kutatások eredményei alapján 2003-tól tervbe vettük a természetes antioxidánsok szerepének vizsgálatát a fémionok metabolizmusára és a redox-homeosztázisra vonatkozóan májbetegségekben, gyulladásos bélbetegségekben, intestinalis tumorokban és porphyria cutanea tardában. A kísérletes és humán tanulmányokat ETT, OTKA és NKFP támogatással végeztük.

A szervezetben lejátszódó szabadgyök-reakciók direkt módszerekkel történő kutatása speciális, drága műszereket igényel és rendkívül nehézkes, mert az összetett rendszerekben, az előre nem látható zavaró hatásokat ki kell küszöbölni, a „tisztá rendszereknek” viszont alig van köze a valóságban lejátszódó folyamatokhoz. E problémák miatt indirekt vizsgálati módszereket kellett kifejleszteni, ill. átdolgozni. Ez nem volt könnyű feladat, mert ahogy bővült a tudásanyag, úgy ismertük fel a módszerek határait.

A tévedések kizárására több irányban kellett kutatásokat végeznünk. Kezdetben, az irodalomban fellelhető és könnyen kivitelezhető módszereket vettük át, majd saját fejlesztésű módszereket alkalmaztunk a máj- és epebetegségek patomechanizmusában, a gyulladásos bélbetegségek, intestinalis tumorok és a diabetesben szerepet játszó szabadgyök-reakciók kutatásához. A saját fejlesztésű luminometriás vizsgálati módszerek alkalmasnak bizonyultak a májtranszplantáltak antioxidáns státuszának tanulmányozására is (Blázovics 1999a, Sípós 2001, Sárváry 2001).

2004-től tovább kutatjuk a természetes antioxidáns készítmények élettani és kórélettani hatását különös tekintettel a szöveti redoxi-státusz változására és a fémionháztartásra. E kutatásokat egy ismét elnyert NKFP támogatja. A lipidszintet csökkentő és immunmoduláns antioxidánsok útjára vagyunk kíváncsiak a szervezetben, ezért vizsgáljuk szerepüket a máj- és bélműködésben. Tervünk sikeres végrehajtása, melyhez új lumineszcenciás, fluoreszcenciás és HPLC-s módszerek kifejlesztésére is szükségünk van, a táplálkozási antioxidánsok hasznosulásának, illetve szervezetben történő „mozgásának” megismerését eredményezi, mely által tervezhetővé válik az antioxidáns kiegészítő terápia a májbetegségek és a gyulladásos bélbetegségek esetében. Embereken végzett vizsgálatainkban többek között arra vagyunk kíváncsiak, hogy a koleretikus,

kolekinetikus és antioxidáns hatású Raphacol (fekete retek készítmény) tartósan szedett kis dózisa hogyan befolyásolja az anyagcserét, jelent-e védelmet a szabadgyök-károsodásokkal szemben. Jelentkezik-e valamilyen nem kívánt hatás IBD-ben szenvedőkben. E kutatásokkal az antioxidáns kiegészítő terápia hatékonyságát szeretnénk igazolni gyulladásos bélbetegségekben. Kutatásaink eredményei alapján biztonságosabbá válna a familiáris előfordulás miatt várható gasztrointestinalis megbetegedés prevenciója és hatásosabb lenne a szekunder prevenció is.

Röviden összefoglalva, az elmúlt 20 év alatt kifejlesztettünk több állatkísérletes modellt, hogy tanulmányozhassuk a természetes eredetű antioxidánsok hatásmechanizmusát és hatásspektrumát a májban és a bél különböző szakaszaiban (Blázovics 1992, 1993, Horváth 1993, Hagymási 2000, 2001a, Sípos 2001, 2002). A meghatározásokat szöveti homogenizátumokban, plazmában, vörösvértestekben és májmikroszomán végeztük. Úgy csoportosítottuk a különböző laboratóriumi vizsgálatokat, hogy a szabadgyök-kutatások során alkalmazott indirekt in vitro és in vivo módszerekkel együtt alkalmazva megfelelőek legyenek egzakt következtetések levonására.

Elvégeztük különböző gyógynövénykivonatok, teák és készítmények részleges fitokémiai és elemanalízisét, majd meghatároztuk protondonor-aktivitásukat, redukálóképességüket és össz-scavenger kapacitásukat (Kéry 1992, Blázovics 1993a,b, 1994a, 2003a, Hagymási 2000, Fejes 2000, 200a,b, Czinner 1999, 2000, 2001, 2003). Több antioxidáns esetében ESR- és impulzus-radiolízis vizsgálatokra is sor került (Prónai 1993, György 1990, 1992).

A kutatási programon belül in vitro, in vivo állatkísérleteket és embereken végzett vizsgálatokat folytattunk a szöveti redox-homeosztázis meghatározására egészségesekben és betegekben. Kidolgoztunk több módszert, ami a redox-homeosztázis tanulmányozására alkalmas, és gyors, rutinvizsgálatok elvégzését teszi lehetővé plazmából és vörösvértestből.

Kutatási munkánk célja tehát az volt, hogy igazoljuk a szabadgyökös reakciók fiziológiás és patológiás jelentőségét, az antioxidáns védelem sokrétűségét. Vizsgáljuk a természetes eredetű antioxidáns molekulák hatását különböző kísérletes és humán betegségekben. E kutatásokhoz egzakt módszereket fejlesszünk ki.

2. IRODALMI HÁTTÉR

2.1. A redox-homeosztázis sejtszintű alapjai

A szabadgyök-kutatás ismét virágkorát éli. Amióta a molekuláris biokémikusok is szükségszerűen felfedezték maguknak a szabad gyököket, azóta egyre több bizonyíték gyűlik össze arra vonatkozóan, hogy a szabad gyökök a földi élet meghatározó elemei.

2.1.1. Az arachidonsavkaskád vegyületei, a szabad gyökök és az immunrendszer aktiválódása

A prosztaglandinok olyan aktív oxidált lipidmolekulák, amelyek számos életfunkciót képesek szabályozni, például a vesék működését, a trombocitaaggregációt, a neurotranszmitter- release-t és az immunfolyamatokat. Különösen fontos képviselőjük a PGE_2 és a 15-d-PGJ_2 . A prosztaglandinszármazékok befolyásolják az immunreakciókat, a gyulladásos folyamatokat, kimutathatóak a rák progressziójában és tumornövekedést gátló hatásuk is ismert (Goodwin 1991, Cosme 2000, Rocca 2002).

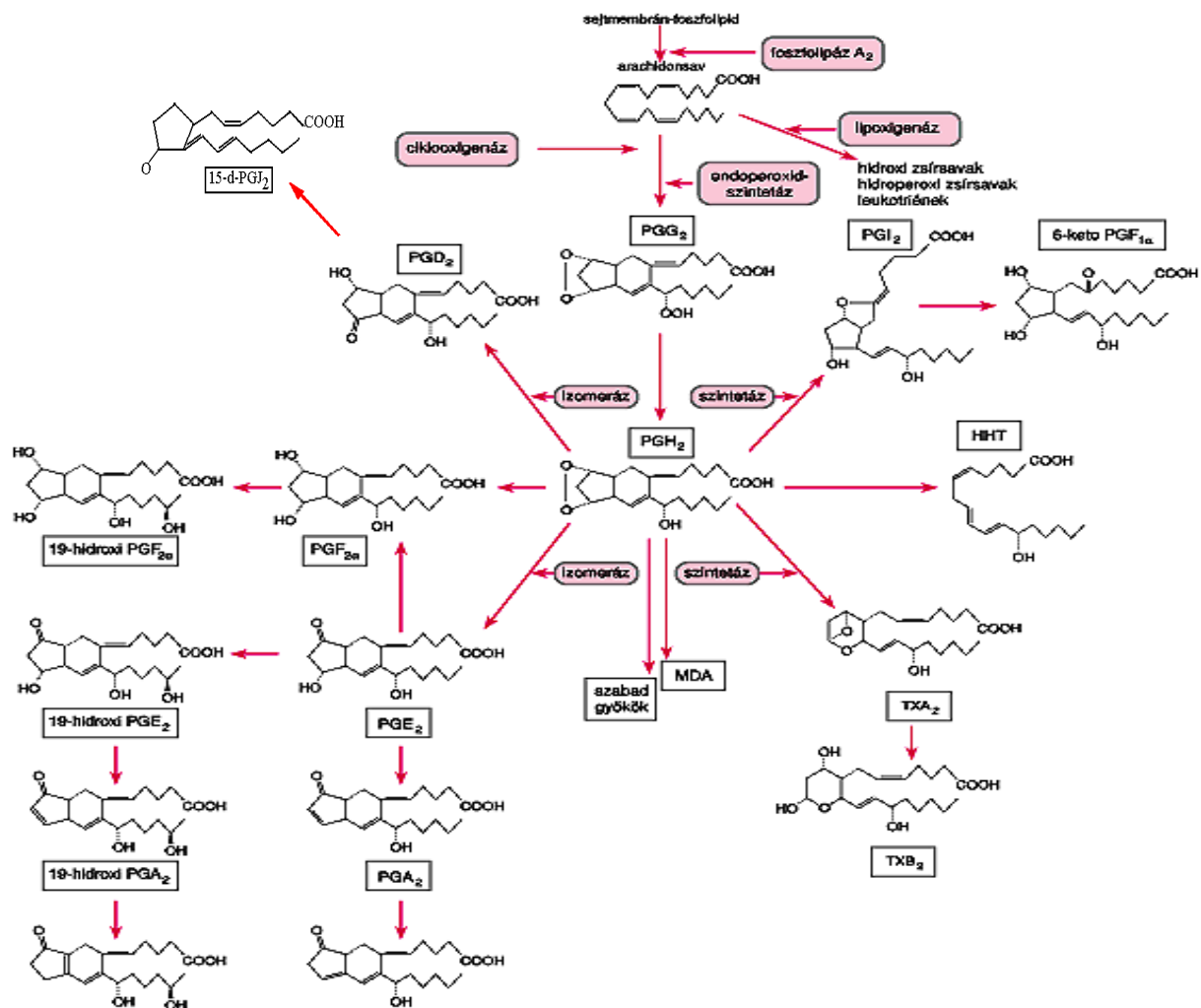
Az arachidonsavkaskádban enzimatisz átalakítások során számos, élettani funkciót szabályozó eikozanoid keletkezik (Nelson 1982, Goodwin 1991). Az autakoid prosztaglandinok fiziológiás koncentrációja femtomol (10^{-15}g/ml) nagyságrendű. Életidejük rövid (1/2-5 perc féléletidő) és hatásuk átmeneti. Az arachidonsav a 18 szénatomszámú 18:3-as γ -linolénsavból (n-6) képződő 20:3 dihomó- γ -linolénsav láncnövekedése és deszaturációja során képződik. A telítetlen zsírsavak jellemzően a trigliceridek középso zsírsavai. Ha ebben a pozícióban 18:3-as α -linolénsav (n-3) van, akkor a bioszintézis során 20:5 eikozapentaénsav és 22:6 dokozahexaénsav keletkezik. Ezen a szintézisúton PGI_3 aktív, és a TXA_3 biológiailag inaktív származékok keletkeznek (Borgeat 1976, Nelson 1982, Goodwin 1991, Balsinde 1999).

A COX1 konstitutív, és a COX2 indukálható ciklooxygenáz enzimek segítségével (bizonyították a COX3 izoenzim létét is) beinduló kaskád számos oxidált zsírsavat eredményez (Henry 2002). A PGG_2 endoperoxid-szintetáz hatására képződik, majd PGH_2 -vé alakul (Van der Ouderaa 1997, Smith 1991). A PGH_2 kulcsintermedierek számát a PG bioszintézis úton. A PGH_2 érzékeny az enzimatisz és kémiai átalakulásokra (Liu 1992). A PGG_2 és PGH_2 szintézisében egy ciklooxygenáz és peroxidáz aktivitással rendelkező PG endoperoxid-szintetáz vesz részt. A PGH_2 -ből tromboxán-szintetáz hatására 30 secundum életidejű tromboxán- A_2 keletkezik, majd a vegyület stabil TXB_2 -vé és 2,3-di-nor- TXB_2 -vé konvertál (Samuelsson 1978, Head 2003). A PGH_2 prosztaglandin-szintetáz segítségével a mindössze 3 perc életidejű PGI_2 -vé alakul át, majd 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, stabil termék keletkezik. A dioxigenálási lépés és az ezt követő ciklizáció szabadgyökös mechanizmusú. Redukcióval $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$ -vá, izomeráz hatására PGE_2 -vé és PGD_2 -vé

alakul. A PGE_2 -ből 19-hidroxi- PGE_2 , majd ebből 19-hidroxi- PGA_2 , illetve egy másik úton PGF_2 - α -n át 19-hidroxi- PGF_2 - α szintetizálódik. PGE_2 -ből közvetlenül képződhet PGA_2 (Nelson 1982). A ciklooxygenáz működését gátolja a PGG_2 és PGH_2 képződését kísérő ROS felszaporodása, ugyanakkor az NO molekula aktiválja a COX-enzimeket (Salvemini 1993). A PGG_2 kis koncentrációban stimulálja a ciklooxygenázok aktivitását. A PGE_2 és PGF_2 - α főbb metabolitjai kimutathatók az oxidatív károsodásokban. A biciklusos endoperoxidokból malondialdehid és 17 szénatomos karbonsav, a HHT képződik (1. ábra) (Nelson 1982, Hughes 1999, Blázovics 2001).

1. ábra.

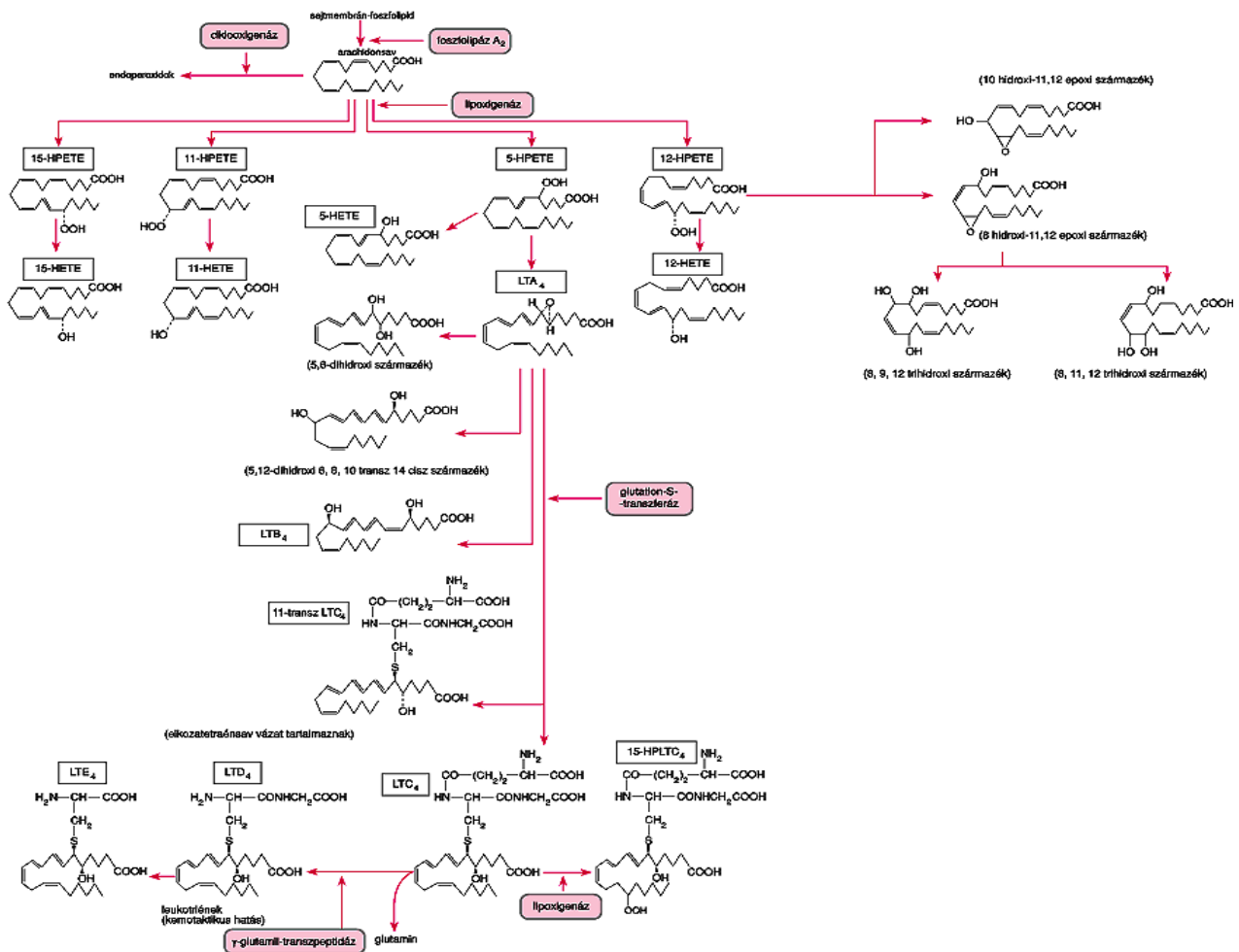
Prostaglandinok bioszintézise



Az arachidonsav hidroperoxisavakká (15HPETE) oxidálódhat a 15-lipoxigenáz (15LOX) segítségével, majd epoxisavakká alakul (15 HETE). A 12LOX enzimaktivitás 12HPETE-at és 12HETE-at eredményez. Az 5HPETE az 5LOX közreműködésével jön létre, mely 5HETE-vá alakul (Pace-Asciak 1989, Samuelsson 1978, 1983). Az 5HPETE az LTA_4 , LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 és LTF_4 leukotriének kiinduló vegyülete lesz. Az LTC_4 leukotriénből γ -glutamil-transzpeptidáz hatására LTD_4 keletkezik (Bach 1977, Bach 1980, 1980a, Shimizu 1986). Az LTD_4 -ből enzimatikusan újabb vegyület, az LTE_4 -képződik (2. ábra). A proszttaglandinok és

leukotriének képződését szabad gyökök megjelenése iniciálja (Bach 1980, Polya 2002). Szabad gyökök hatására fokozódik a foszfolipáz A₂ aktivitása is. Az LTB₄ és az IL-2 egyaránt fokozzák az NK-sejtek aktivitását (Gergely 2000).

2. ábra Leukotriének bioszintézise



Az eikozanoidok különösen fontos, igen eltérő hatású "ubiquitaer" vegyületek. Számosuk proinflammatorikus hatású, fokozzák a vasodilatációt, növelik a vascularis permeabilitást, hyperalgesiát okoznak, granulocita-kemotaxiszt, trombocitaaggregációt, B- és T-sejt-proliferációt, NK-sejt citotoxicitást váltanak ki és degradálják az extracelluláris mátrixot. Az antiinflammatorikus PGI-k, PGE-k és a PGD-k felelősek a trombocita- és leukocita- aggregáció gátlásáért, a leukocitamigráció és a T-sejt-proliferáció csökkentéséért. Az eikozanoidok számos szöveti modulátort szinergizálnak. Ezáltal az arachidonsavkaszkádban képződő prosztaglandinok és leukotriének képesek befolyásolni az immunfolyamatokat. A ciklooxygenáz és a lipoxigenáz úton képződő szabad gyökök hozzájárulnak az immunreakciók szabályozásához (Blázovics 2001, Polya 2002).

A nem szteroid gyulladáscsökkentők, az NSAID-ok (aszpirin, indometacin, ibuprofen), illetve a kortikoszteroidok gátolják a prosztaglandinok bioszintézisét, és egyben gátolják a proinflammatorikus fehérjék, mint például az iNOS szintézisét, és a proinflammatorikus citokinek termelését. Az NSAID-ok kiválthatnak colitis ulcerosát is azáltal, hogy fokozzák a membránpermeabilitást (Cronstein 1995, Hori 2001). A COX1 bénítása a gyomor védelmét biztosító prosztaglandinok kiiktatása miatt megfontolandó. A szelektív COX2-gátlás azonban a fiziológiás PG-szintézist nem befolyásolja, ezáltal mellékhatása a gyomor mucin- termelésére nem jelentkezik (Whittel 1990). Ha megértjük a prosztanoidok szerteágazó hatását, akkor lehetőség nyílik terápiás hasznosításukra.

A PGE₂, mint már említettük, az egyik legfontosabb vegyület. Reguláló hatása már több mint 20 éve ismert (Nelson 1982). Ezt a prosztaglandint számos sejt képes termelni, mint például a fibroblasztok, a makrofágok és a különféle malignus sejtek. A PGE₂ eltérő hatásait az EP₁, EP₂, EP₃, EP₄ receptorokon keresztül fejti ki (Narumiya 1986, Noguchi 2001, Iwasaki 2003, Jozefowski 2003). A PGE₂ egyszerre több receptorra is hathat. A receptorszubtípusok izoformjai (α, β, γ) is ismertek. E receptorok rodopszin-típusú szerkezetek, melyek 7 feltekert hidrofób transzmembrán doménből állnak. A receptorok intracelluláris oldalukon G-proteinekhez kapcsolódnak és különböző szekunder messenger szignálutakat használnak. Az EP₁ a G_{q/p}-vel kapcsolódik és így a PGE₂ növeli az intracelluláris Ca⁺⁺-szintet. Ha a PGE₂ EP₂ és EP₄ receptorokhoz kötődik, akkor a receptorok G_s-proteinhez kapcsolódva növelik a cAMP szintjét, ami hat a génszabályozásra. Az EP_{3 α, β, γ} izoformok G_i-proteinhez kapcsolódnak. A PGE₂ ezen az úton képes gátolni a cAMP szintézisét. Sok bizonyíték alapján azt feltételezik, hogy az EP₃ befolyásolja a szignáltranszdukciós utakat. Az EP₁, EP₃, EP₄ ubiquitos receptorok a magmembránban is megtalálhatók. Az EP_{3 γ} és az EP₄ az endotélsejtek magmembránjában lokalizáltak, és modulálják az iNOS-gén kódolását (Bhattacharya 1999, Harris 2002, Head 2003).

A PGE₂ egyaránt hat a T- és B-sejtekre és az antigénprezentáló sejtekre is. A PGE₂ befolyásolja a CD4⁺ sejtek proliferációját, apoptózisát és citokintermelését is (Chouldry 1999a,b, Cosme, 2000). A PGE₂ növeli a T-sejtek IL-4-, IL-5- és IL-10-termelését, ugyanakkor gátolja az IL-2 és IFN γ szintézisét. A PGE₂ fontos szerepet játszik a B-sejtek fejlődésében és aktivitásában is. Hatására fokozódik az IgG1- és IgE-termelés. Az antigénprezentáló sejtek is érzékenyen reagálnak a PGE₂-re. A makrofágokban nő az IL-10, és gátlódik az IL-12 expressziója. A dendritikus sejtekben csökken a TNF- α , IL-1 β , IL-12 és az IL-12R expressziója. Mindent egybevetve a PGE₂ hatására fokozódik T_H2, és gátlódik a T_H1 válasz. A bakteriális LPS a makrofágokat TNF- α - és IL-1- termelésre készíti, ennek következtében a COX2 upregulálódik és a PGE₂-termelés fokozódik, így nő a vasopermeabilitás, vasodilatatio és az ödéma (Kawakami 1990, Dohi 2000, Harris 2002, Polya 2002).

Régebben azt gondolták, hogy a proszttaglandinok J-sorozatának képviselői a PGD_2 metabolitok inaktív végtermékei. Az újabb kutatások azonban igazolták, hogy e vegyületek szerepet játszanak az adipogenesisben, a gyulladásokban és a tumorképződésben (Jozkowicz 2001). Igazolták a 15-d-PGJ₂ szintézisét hízósejtekben, T-sejtekben, trombocitákban, alveoláris makrofágokban. Ma még kérdéses, hogy a 15-d-PGJ₂ hogyan jut be a sejtekbe. Bizonyítékok vannak arra, hogy a sejtek aktív transzporttal veszik fel a vegyületet, de nem kizárt, hogy ez a ciklopentanon proszttaglandin receptormediált úton is bejuthat a sejtbe. Az bizonyos, hogy a sejttagon belül a gének transzkripcióját befolyásolja. Az is elképzelhető, hogy a PGD_2 anionos transzportmolekulák segítségével jut be a sejtbe, majd a citoplazmában alakul át 15-d-PGJ₂-vé (Harris 2002). A 15-d-PGJ₂ a sejtmagba egy nukleáris transzporter fehérjén keresztül jut be és aktiválja a $\text{PPAR}\gamma$ -át, hogy az szabályozza a génátírást. Egy másik mechanizmus szerint közvetlenül is képes regulálni a transzkripciót (Kliewer 1995, Lehmann 1997).

A $\text{PPAR}\alpha$ és γ a PPAR -proteinek családjához tartozik (Ricote1998). A $\text{PPAR}\gamma$ elsődlegesen az adipocita-szövetben, a mellékvesékben és a lépben expresszálódik. Szabályozza az adipocita-differenciálódást és a glükóz-homeosztázist. A 15-d-PGJ₂ képes hozzákötődni a $\text{PPAR}\gamma$ -hoz, és így befolyásolja a target gének transzkripcióját. A $\text{PPAR}\gamma$ gátolja az AP-1- és az NF- κ B-aktiválást is (Ricote1998, Delerive 2000). A 15-d-PGJ₂ antiinflammatorikus hatása abban rejlik, hogy gátolja az iNOS-, a TNF- α - és az IL-1 β -termelést a makrofágokban (Rossi 2000, Castrillo 2000, Straus 2000). Arra vonatkozóan is találni adatot, hogy a 15-d-PGJ₂ erősíti a gyulladásos folyamatokat a foszfolipáz A₂ és a COX₂ gének expressziójának indukálásával a simaizomsejtekben (Meade1999, Harris 2002).

A PGE₂ és a 15-d-PGJ₂ ellentétesen hatnak a tumorsejtekre. A PGE₂ fokozza a tumorsejtek proliferációját, és indukálja a mátrix metalloproteinázok képződését, ami a metastasist felgyorsítja. Hatására csökken az apoptózis gyakorisága. A 15 d-PGJ₂ mint potenciális anti-tumor ágens viszont gátolja a tumorsejtek képződését. Csökkenti a mátrix metalloproteinázok termelését és gátolja a malignus sejtek proliferációját, valamint direkt módon, vagy a $\text{PPAR}\gamma$ -án keresztül vagy a ciklin D1 gátlásával stimulálja az apoptózist (Vanaja 2000, Takashima 2001, Fuhrer 2001, Harris 2002)

Makrofág-sejtkultúrában (RAW 264.7) a 15-d-PGJ₂ képes volt gátolni az LPS- és IFN- γ -dependens NO-szintézist, mely nem volt antagonizálható PGJ₂-vel és PGE₂-vel, illetve $\text{PPAR}\gamma$ liganddal. Ha az aktivált makrofágokat 15-d-PGJ₂-vel inkubálták, gátlódott az I κ -B α és az I κ -B β degradációja, és nem aktiválódott az NF- κ B, illetve leállt az NF- κ B-dependens gének transzkripciója. Ennek következtében a 2 típusú NO-szintetáz és a COX2 átírása meggyengült. A háttérben a 15-d-PGJ₂-nek az I κ B-kinázra kifejtett gátló hatása húzódik meg, aminek következtében nem foszforilálódik az NF- κ B inhibitora, az I κ B, és nem teszi lehetővé az NF- κ B

aktiválódását. A 15-d-PGJ₂ azonban közvetlenül is képes gátolni az I κ -B foszforilációját a 32-es szerinnél (Castrillo 2000).

2.1.2. Citokinek a gyulladásos folyamatok mediátorai

A kis, 10-40 kDa molekulatömegű oldható citokinmolekulák a sejtfelszíni receptorokhoz kötődve biztosítják a sejtek közötti kommunikációt. Hatásukat célreceptorokon keresztül fejtik ki. Már igen kis koncentrációban (pmol) is hatékonyak. Ezeket a kis peptideket az immunrendszer sejtjein kívül más sejtek is képesek szintetizálni. Elnevezésük általánosan az immunbiokémiai folyamatokkal kapcsolatos, így szinonimaként interleukineknek és kemokineknek is nevezik őket (Dinarello 1989, Rosztóczy 1993, Cseh 1993).

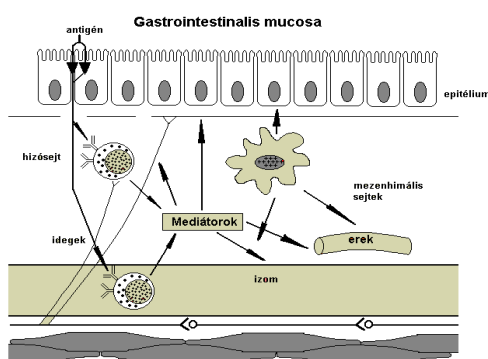
Immunmoduláló hatásuk autokrin, parakrin, pleiotróp és ritkán endokrin (Old 1985, Falus 1993, Tracey 1994, Gergely 2000, Cosme 2000). Autokrin tulajdonságuk következtében maga a termelő sejt a célpont. Parakrin hatásukból eredően közvetlen környezetükben található sejteket készítetik citokin-termelésre. Endokrin hatásuk miatt távoli sejtcsoportok aktiválását is eredményezhetik. Pleiotróp sajátosságuk következtében egyszerre sokféle hatást válthatnak ki a különböző targetsejteken. Ugyanakkor redundancias is, mert többféle citokin képes azonos választ kiváltani. Ismert a citokinek közötti szinergista és antagonistá kölcsönhatás is. A citokinek fokozzák vagy gátolják az immunkompetens sejtek aktiválását, proliferációját és differenciálódását, ezáltal szabályozzák az immunfolyamatokat, az immunválasz intenzitását, tartamát, az ellenanyagok szintézisét, további citokinek termelését. A gyulladásos folyamatokban prosztanoidok, vírusok és bakteriális endotoxinok hatására termelődnek (Tetsuka 1994, Jozkowicz 2001). Számos patogén kapcsolatba hozható a colitis ulcerosa kialakulásával: *Escherichia coli*, *Diplostreptococcus*, *Clostridium difficile*, *Fusobacterium necrophorum*, *Shigella* sp, *Helicobacter hepaticus*, RNA vírus, *Bacteroides vulgatus*, *Yersinia* sp. (Warmsley 1998, Farrel 2000, Iwasaki 2003, Ishii 2004). A baktériumok aktiválják az intesztinális immunsejteket és az epiteliális sejteket. A szekréta citokineket, reaktív oxigén specieszeket, NO-ot, proteázokat és eikozanoidokat tartalmaz, aminek következtében a mucosa károsodik (Haddad 2002, Head 2003).

A gyulladásos citokinek közé tartoznak az IFN- α , β , γ , IL-1 α , β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , β , MIF és a kemokinek. E peptideket főleg a mononukleáris fagociták, a γ/δ T-sejtek, a granulociták, a hízósejtek, a fibroblasztok és az endotélsejtek szintetizálják. Ezek a citokinek okozzák a gyulladásos válaszreakciókat, indítják el a fajlagos immunsejtek aktiválódását és szabályozzák differenciálódásukat (Gergely 2000, Haddad 2000, Polya 2002).

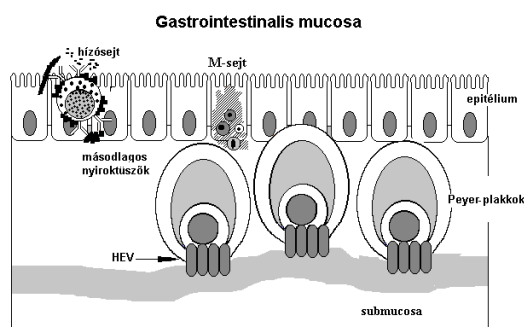
A Gram (–) kórokozók hatására először megjelenő TNF- α az aktivált makrofágokból származik (Braegger 1992). A TNF- β a T-sejtek produkta. Az IL-1-et a monocyta-makrofág vonalba tartozó sejtek termelik TNF- α , vagy bakteriális LPS hatására. A szisztémásan és lokálisan is ható

IL-1-et a T- és B-limfociták, NK-sejtek, neutrofilek, granulociták, epitél- és endotélsejtek, asztrociták és gliasejtek is szintetizálják. Az IL-6-ot a TNF- α és IL-1 megjelenését, illetve hatását követően a mononukleáris fagociták, endotélsejtek, fibroblasztok, és aktivált T-sejtek termelik. Az IL-6 tulajdonságai hasonlítanak a TNF- α -ra és IL-1-re. Hatására megindul a B-sejtek differenciálódása és ellenanyag- termelése. Az aktivált T- és NK-sejtek viszont IFN- γ -át termelnek. Az IFN- α,β vírussal fertőzött leukocitákból és fibroblasztokból, illetve az IFN- γ az NK-sejtekből, T-limfocitákból, T_H -1 és $CD8^+$ sejtekből szabadulnak fel. Az IL-10-et az aktivált T_H -2 sejtek, $CD5^+$, B-sejtek, monociták és keratinociták termelik. Megjelenése az antigénprezentáló sejtekre történő hatásán keresztül befolyásolja a T_H -1/ T_H -2 arányt. Gátolja az IL-12 szintézisét, a B-7 kostimulátor molekula megjelenését, ill. a T_H -1 sejtek aktiválódását. Ellenanyag-termelésre készíti a B-sejteket és nélkülözhetetlen a B1-sejtek fejlődéséhez. Ez a molekula azonban gátolja a gyulladásos folyamatokat. Az IL-12 aktiválja az NK-sejteket és a citotoxikus effektorsejteket, közvetlen és IFN- γ -közvetített módon fokozza a T-sejtek T_H -1 sejtekké alakulását és azok IFN- γ -termelést (Old 1985, Kalinski 1998, Karafilov 1999, Gergely 2000, Dohi 2000, Iqbal 2002).

3. ábra



4. ábra



A 3. és 4. ábrán azok a sejtek láthatók, melyek részt vesznek az antigénekre adott fiziológiás válaszban (Perdue 1992)

Kemokinek hatására fokozódik a sejtek adhéziója és a kemotaxis, valamint fokozódik az effektor leukociták aktiválása. A leukociták aktiválásakor szabad gyökök és lipidszármazékok szabadulnak fel. A kemokineket a monociták, endotélsejtek, keratinociták, fibroblasztok, T-limfociták és simaizomsejtek termelik. A kemokinek a gyulladás helyére vonzzák a makrofágokat és a granulocitákat, valamint részt vesznek a limfocita „homing”-ban (Malaguarnea 2001).

A bél mucosa tok nélküli limfoid szövetében a GALT-ban (gut associated lymphoid tissue) számos immunsejt található. Itt helyezkednek el a speciális M-sejtek, melyeknek zsebeiben T- és B-limfociták, valamint makrofágok találhatók. Ezek a sejtek szállítják az antigént a limfoid szövetbe. Az ileumban található Peyer-plakkok másodlagos nyiroktüszők, amelyekben

antigének hatására B-sejtek aktiválódnak és IgA-termelő plazmasejttekké alakulnak (Neutra 1992, Baranov 2004, Lo 2004, Pabst 2004).

A CD-ben és CU-ban megjelenő citokinek és gyulladásos mediátorok eltérő mintázatot mutatnak (1. táblázat). Az ulceratív colitis klasszikus lézióira és a nagy kiterjedésű epiteliális károsodásokra jellemző, hogy e területek neutrofilekben gazdagok, és a kripták abscessusai miatt az immunmechanizmusok felerősödnek (MacDonald 1994). Az 1-es táblázatban a citokinmintázat látható CU-ban és CD-ben (MacDonald nyomán 1994).

1. táblázat

Citokinmintázat CU-ban és CD-ben		
citokinek	colitis ulcerosa	Crohn-betegség
(szint)		
IL-1	szérumban normális mucosában emelkedett	szérumban normális mucosában emelkedett
IL-2	szérumban és mucosában normális	szérumban és mucosában emelkedett
IL-6	szérumban normális mucosában emelkedett	szérumban és mucosában emelkedett
IL-8	nem mérhető szérumban magas mucosában	nem mérhető szérumban nem ismert mucosában
IF-γ	szérum szint nem ismert normális mucosában	szérum szint nem ismert magas mucosában
TNF-α	szérum- és mucosaszint magas	szérum- és mucosaszint magas

Sok kutató azt feltételezi, hogy CD-ben a T-helper 1 (sejt-mediált) immunreakciók játsszák a döntő szerepet, és CU-ban a T-helper 2 (humorális) immunreakciók a dominánsak (Rutgeerts 2001, Head 2003). A betegség immunháttére azonban ennél bonyolultabb (Head 2003). CU-ban bizonyítható a fokozott humorális immunválasz, mert magas az immunglobulinok és autoantitestek szintje. CU-ban különösen az IgG1 szintje magas a mucosális plazmasejtekben (Kett 1987, Head 2003). Anticolon és antineutrophil antitesteket detektáltak CU páciensek szérumból (Duerr 1991, Das 1993). Kimutattak egy 40 kDa proteint is a colon- epitheliumban, amely IgG antitest választ kezdeményezett (Das 1978). Immunglobulinok és komplementek találhatóak a colonenterociták apikális felszínén, ami bizonyítja a potenciális autoimmunválaszt (Halstensen 1993). CU-ban emelkedett a T_H-2 sejtek és hízósejtek által termelt IL-5 szintje és nem szignifikánsan emelkedett az IFN- γ és más citokinek mennyisége is, melyek kapcsolatba hozhatók egy jelentősen aktív T_H-1 válasszal (Blumberg 2001). Az IL-5 a limfociták aktivációját és differenciálódását szabályozza, célsejtjei a B-sejt és az eozinofilek. Más kutatók beszámoltak arról, hogy CU-ban magasabb az IL-8 szintje a CD betegekhez és egészségesekhez viszonyítva (Mahida 1992). A generalizált gyulladással összefüggésben IL-1, IL-6 és TNF- α mutatható ki mindkét bélbetegségben (MacDonald 1994). Állatkísérletben mind a T_H-1-, mind a T_H-2-mediált

állapotokra vonatkozó adatokat igazolták. Azt találták, hogy a T_H -1 citokin válaszok akut transzmurális és fokális léziókban, míg a T_H -2 citokin válaszok a kripták diffúz atrophijájában és a mucosalis rétegben jelentkeznek (Dohi 2000).

2.1.3. Transzkripció faktorok

A sejtciklus szabályozása függ az intracelluláris redoxi-állapottól. A redoxi-szabályozott transzkripció faktorok közül az NF- κ B és az AP-1 a legismertebbek, és a leginkább kutatott fehérjék. Az NF- κ B heterodimer transzkripció faktor, mely kb. 150 gén transzkripcióját befolyásolja, részt vesz a gyulladásos folyamatokban, az immunválaszban, a stresszhatásokban és az apoptózisban. Az NF- κ B sejtmagba történő transzlokációja bonyolult reakciósorozat eredménye, amelyben NIK, MEKK, IKK kinázok vesznek részt. Az NF- κ B a citoszolban I κ B gátló fehérjéhez kapcsoltn inaktív állapotban van mindaddig, amíg a sejt redoxi-állapota nem változik meg. Az I κ B lehasításában a foszforilációt az I κ B kináz végzi. Az I κ B ubikvitinációját és proteaszóma degradációját követően a szabaddá váló szekvencia révén az NF- κ B a sejtmagba transzlokálódik és megkezd a megfelelő gének átírását (Hagymási 2002, Kopper 2002).

Az ubikvitin-proteaszóma (proteázkomplex) rendszer a sejt saját, lebontásra ítélt fehérjeit eltakarítja. A kiválasztott fehérjékhez ubikvitinmolekulák kapcsolódnak. Az ubikvitináció után ismeri fel a proteaszóma a bontani kívánt fehérjét. Ez a proteázrendszer maga is szabályozó szerepet tölt be, mert a lebontott fehérjemolekulák rövid életűek, hatékony degradátumok. Az ubikvitin-proteaszóma-rendszer működése több szempontból is fontos, mert a DNS-állomány javításáért, a sejtciklus szabályozásáért, a károsodott fehérjék lebontásáért, a transzkripcióért, a sejt differenciálódásért stb. felelős. A p53 degradációját az MDM2 segítségével (sejtmag és membránkötött fehérje) szintén az ubikvitin-proteaszóma-rendszer végzi. A p53 transzaktivációs képessége jelentősen fokozódik a SUMO (small ubiquitin like modifier) kötődésekor. Ha hibásan működik az ubikvitin-proteaszóma, akkor a p53-szint növekedése bonyolult folyamatok során át megállíthatja a sejtciklust a G1 fázisban. A megnőtt p53-aktivitásra válaszolva a bax gén fokozott expressziója felgyorsítja az apoptózist. Ha a bcl2 gén expressziója is csökken, az további támogatást jelent az apoptózis bekövetkeztéhez. BCL2 fehérje hiányában a mitokondrium-membránban proapoptotikus csatornák alakulnak ki a BAX fehérje membránban történő lokalizációját követően. Így citokróm c szabadul ki a citoszolba, mely beindítja a kaspáz-kaskád rendszert és aktiválja a kaspáz 9-et. Az NF- κ B aktiválódása és transzlokációja a magba anti-apoptotikus hatású, mert szuppresszálja a kaspáz-8-aktivációt (Kopper 2002).

IBD-ben számos immunoreaktív citokin lokálisan termelődik. A legfontosabb e modulátorok közül az IL-1, IL-6 és a TNF- α . Mindhárom citokin képződése az NF- κ B transzkripció faktor

által szabályozott. Az NF- κ B antigének, vírusok, baktériumok, peroxidázok, gyulladásos limfokinek és szabad gyökök hatására indukálódik. Az NF- κ B p65 alegységét teszik felelőssé a krónikus gyulladások fenntartásáért (Pavlick 2002).

2.1.4. Szabad gyökök szerepe a szignáltranszdukcióban

Számos tudományos felismerés igazolja a szabad gyökök közvetlen vagy közvetett hatását a szignáltranszdukcióra (McKenzie 1996, Pavlick 2002, Ramachandiran 2002). A szervezet redox-homeosztázisát bonyolult, érzékeny rendszer biztosítja, amelyben külső és belső tényezők egyaránt szerepet kapnak. A szervezet működésének feltétele a szabad gyök – antioxidáns egyensúly, amely nélkülözhetetlen a sejtproliferáció és az apoptotikus sejtpusztulás szigorú kontrolljához.

Az elsődleges védekezés az oxigén atmoszférával szemben az alacsony szöveti oxigén tenzió, ami kb. 26 Hgmm. Az intracelluláris redoxi-állapot legfontosabb elemei a ciszteintartalmú fehérjék. A szervezet redox-homeosztázisának fenntartásában a legfontosabb a glutation oxidált/redukált alakjának aránya. Az oxidált glutation a NADPH koenzim által a glutation-reduktáz enzim segítségével alakul át redukált formává, és így képes a glutation-peroxidáz enzim segítségével oxidált molekulák regenerálására. A redukáló ekvivalensek pótlását a pentóz-foszfát kör biztosítja. A szelénium-dependens glutation-rendszer a citoszolban és a mitokondriumokban található. A glutation képes redukálni a glutaredoxint is. A hőstabil tioredoxin fehérje szulfhidrilcsoportjai szintén részt vesznek a redox-homeosztázis fenntartásában. A szulfhidrilcsoportok redukciójához – a glutationhoz hasonlóan – NADPH kofaktor szükséges. A redukciót a flavoprotein tioredoxin-reduktáz végzi.

A tioredoxin és a glutaredoxin, valamint más fehérjetiolok a NADPH hidrogénjének felhasználásával a ribonukleotid-difoszfát-reduktáz enzim segítségével Mg^{2+} ionok jelenlétében a ribonukleotidokat dezoxiribonukleotidokká redukálják. A redukált tioredoxin a redoxfaktor 1-et (Ref1) is képes redukálni, amely a NF- κ B, AP-1, ATF, Creb EGR transzkripció faktorok redukálását végzi, ezáltal befolyásolja DNS-hez történő kötődésüket (Powis 1997). A GSH közvetlenül is részt vesz az oxigén szabad gyökök közömbösítésében. A tioredoxin a fehérjék szulfhidrilcsoportjainak redukálását végzi, ezáltal befolyásolja a fehérjék térszerkezetének változásait, a receptorhelyek kialakulását és a transzkripció faktorok aktiválását. A protein-diszulfid-izomeráz (PDI) a proteinek térszerkezetének kialakításában vesz részt. Ez az enzim képes a dehidroaszkorbinsavat is visszaredukálni aktív formájába (Hagymási 2002).

A γ -glutamil-transzpeptidáz kulcsenzim az intracelluláris redukált glutation homeosztázisában és a sejten belüli redoxi-állapot fenntartásában. A glutation γ -glutamil-transzpeptidáz által történő extracelluláris hasítása reaktív oxigén termékek képződéséhez vezet, melyet a képződő ciszteinil-

glicin koncentrációja befolyásol. A γ -glutamil-transzpeptidáz reakcióban képződő H_2O_2 részt vesz az NF- κ B aktiválásában (Accaoui 2000).

A γ -glutamil-cisztein-szintetáz katalizálja a glutation szintézisének „rate limiting” lépését. Ez az enzim katalitikus és regulátor alegységekből épül fel, melyeket speciális gének kódolnak. Számos transzkripció faktor mellett az AP1 és NF- κ B faktorok is részt vesznek a katalitikus alegység szabályozásában prooxidánsok hatását követően. A γ -glutamil-cisztein-szintetáz szintézisének szabályozása és az antioxidáns védelmi rendszer más komponenseinek transzkripció kontrollja átfedő (Wild 2000).

Szabad gyökök hatására az extracelluláris szignálregulált kinázok (ERK1/2), a c-Jun N-terminális kinázok (JNK/SAPK) és a p38 mitogénaktivált proteinkinázok (MAPK) gyorsan aktiválódnak (Ramachandiran 2002). Tehát a szabad gyökök, fontos szerepet játszanak az apoptózis indukciójában.

2.1.5. Fémionok és a szignáltranszdukció

A nyomelemek szintén esszenciális szerepet játszanak a szignálmechanizmusok szabályozásában és a transzkripció faktorok működésén keresztül a gének kifejeződésének egész sorát befolyásolják. Az utóbbi években azt is feltételezik, hogy hasonlóan az I κ B kinázok, vagy a fémionok által vezérelt redoxirendszerek működéséhez, a fémek kulcsfontosságúak az NF- κ B és AP-1, illetve az NF- κ B proteaszom degradátumok esetében is. Az NF- κ B DNS-hez történő kapcsolódása a DNS-kötő doménben található p50 alegység „apo62”cisztein redoxi-állapotának függvénye. Ez a kapcsolat különböző nehézfémionok, mint például az As, Cd, Co, Cr, Ni és Pb hatására károsodhat. Az NF- κ B-mediált transzkripció folyamatokban különösen fontossá válnak a V, Cu és más nyomelemek, különösen az allergiás, krónikus gyulladásos, degeneratív vagy tumoros folyamatokban (Kudrin 2000).

A szulfhidrilcsoportokban gazdag metallotioneinek fontos, szabályozó szerepet töltenek be az esszenciális és a toxikus fémionok megkötésével. In vitro igazolt scavenger tulajdonságuk is. Az a tény, hogy mind a fémionok, mind a szabad gyökök, illetve prooxidánsok, valamint a citokinek és hormonok egyaránt indukálják szintézisüket, azt bizonyítja, hogy működésük jelentősen befolyásolja a sejten belüli redoxi-viszonyokat. Overexpressziójuk növeli a sejtek és szövetek oxidatív stresszel szembeni védelmét (Mulder 1994, Viarengo 2000).

A szabad gyökök és fémionok sejten, illetve sejtmagon belüli jelenléte a szignáltranszdukció során arra enged következtetni, hogy e faktorok szerves részét képezik egy ősi, evolúciós stressz-adaptációs mechanizmusnak. Belátható tehát, hogy a szabad gyök - antioxidáns egyensúly,

vagyis a redox-homeosztázis vizsgálata kiemelten fontos a betegségek patogenezisének megismerése és a terápiás hatékonyság szempontjából (Kudrin 2000).

2.2. Lipidanyagcsere, citokinek

Már a korai kutatásokban is kiderült, hogy a zsíryanycsere és az immunrendszer kapcsolatában a citokinek fontos szerepet játszanak (Somogyi 1987, Brito 1992, González-Cabello 1992/1993, Blázovics 1994, Fehér 1996). A citokincsalád számos képviselője, mint például a TNF- α , IL-1, IL-6, PDGF, IFN- β , IFN- γ , TGF- β , MCSF a lipidanyagcsere endogén mediátorai (Grunfeld 1988, Kawakami 1990, Shimano 1990). Ezek a citokinek hatásukat azonban a különböző szövetekben eltérően fejtik ki. A TNF- α adipocitákban például gátolja a lipoprotein-lipáz aktivitását, a májszövetben viszont aktiválja az enzimet, és ezáltal stimulálja a zsírsavszintézist. A citokinek a lipidmetabolizmus anabolikus és katabolikus folyamatait egyaránt képesek befolyásolni. Az adipocitákban a TNF- α gátolja mind a lipoprotein-lipáz, a zsírsavszintetáz és az acetyl-CoA-karboxiláz aktivitását. A TNF- α és az IL-1 megközelítően azonos hatást gyakorol a lipoprotein-lipázra, míg az IL-6 csak kismértékben szuppresszálja az enzimet. Az IL-6 aktivitásához hasonló gyenge gátló hatást vált ki a PDGF, az IFN- β és a TGF- β (Grunfeld 1988, Kawakami 1990).

A TNF- α és IL-1 hatására megnő az intracelluláris lipolízis, melynek következtében kiürülnek a sejtraktárak. A TNF- α gátolja a preadipocita-adipocita átalakulást, vagy elpusztítja a konverzióra elkötelezett sejteket, aminek következtében csökken a zsírraktározás (Kawakami 1990). Monocita kolóniastimuláló faktorról (MCSF) csökkenthető a szérumból zsírsav szintje (Shimano 1990). A PGE₂ növeli az IL-1-képződést. Ciklooxygenáz-gátlókkal, mint például ibuprofennel gátlódik a PG-bioszintézis, és megelőzhető az anorexia kialakulása (Dinarello 1990).

Állatkísérletek és humán tanulmányok bizonyítják, hogy az N-3 politelítetlen zsírsavak képesek mérsékelni a citokinek túlermelődését, ezáltal visszaszorítanak autoimmun folyamatokat, ugyanakkor kontrollálatlan fogyasztásuk kerülendő, mert befolyásolják a citokintermelést. Az N-3 zsírsavak gyengítik a gyulladásokkal és fertőzésekkel szembeni immunválaszt, mert például gátolják az IL-1 szintézisét. Eikozapentaénsav hatására csökken a ciklooxygenáz úton szintetizálódó PGE₂ mennyisége, és nő a lipoxigenáz úton keletkező LTB₄ és LTB₅ koncentrációja, aminek következtében gátlódik a citokinek képződése (Bendich 1990, González-Cabello 1992/1993, Meydani 1996, Barrios-Rodiles 1999).

A lipidek különösen fontos szerepet játszanak a gyulladásos bélbetegségek kezelésében, bár a nutritív terápia hasznossága nem mindig meggyőző. Az N-3 politelítetlen zsírsavak megfelelő antioxidáns kiegészítő kezelés hiányában szabadgyökös károsodásokat szenvednek el, és a

megjelenő lipidperoxidációs végtermékek, mint például a malondialdehid, karcinogén, mutagén hatásuk miatt számos nem kívánt folyamatot indítanak el. A lipidperoxidációs folyamatok gátolják a T-mediált funkciókat, az NK-sejtek aktivitását és a makrofágok citotoxicitását is (Fong 1991, Bartoli 1993, Chung 2000).

Krónikus gyulladásos bélbetegségben a gyakori diarrhea miatt a betegek malnutritioban szenvednek és a katabolikus betegségek valószínűsítik az esszenciális zsírsavhiányt. Akiknél a krónikus bélbetegség miatt esszenciális zsírsav (EFA) deficiencia alakult ki, szükségessé válhat halolaj vagy növényi zsiradék kiegészítő táplálás, vagy súlyos esetben intravénás lipidpótlás (Siguel 1996, Beluzzi 2000).

Már az 1970-es évek derekán felfigyeltek arra, hogy VLDL, IDL és LDL lipoproteinek gátolják a mitogénindukált limfociták blasztosodását. Az is ismertté vált, hogy a telítetlen zsírsavak csökkentik leginkább a mitogénekre adott választ (Curtiss 1976, Curtiss 1977, Morse 1977, Hagman 1979, Hui 1980, Kuo-Hom 1981).

Az oxidált LDL gátolta az LPS-indukált NF- κ B kötődést a DNS-molekulához, és ennek következtében a TNF- α - és IL-1 β -expressziót is makrofágokban (Ohlsson 1996). Később Hamilton és mtsai (1998) azt tapasztalták, hogy az oxidált LDL befolyásolta NF- κ B aktiválását mononukleáris fagocitákban azáltal, hogy módosította az I κ -B degradációját.

Vizsgálatok igazolták, hogy a membránlipid-komponensek összetételének megváltozása a módosult lipidmetabolizmus következtében zavarokat okozhat a sejtek közötti kommunikációban, a citokintermelésben (Kollmorgen 1979). Megfigyelték, hogy az N-3 és N-6 zsírsavak aránya megváltozik CU-ban (Kinsella 1990, Esteve-Comas 1992, Siguel 1996). Ezek a változások befolyásolhatják a colon-szövet zsírsavszintézisét és a luminalis sejtek membránjainak lipidösszetételét, amelyek jelentősek a betegség patogenezisében (Kinsella 1990).

Számos vizsgálat igazolta, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavak koncentrációja a különböző szövetekben eltér az egészségesektől a gyulladásos bélbetegségek mindkét típusában. CD-ben a PUFA szintjét alacsonyabbnak, míg a MUFA-ét magasabbnak találták, ha egészségesekhez hasonlították az értékeket. A betegekben a metabolikus eltérés növelte a MUFA-szintet és az N-6 zsírsavak prekursorainak koncentrációját. A sejtek EFA szegényekké váltak.

A halolaj antiinflammatorikus hatású, ezáltal csökkenteni képes a relapszusok számát CD-ben, bár vannak ellenkező adatok is IBD-ben (Lorenz 1989, Salamon 1990, Stenson 1992, Shoda 1995, Beluzzi 1996, Loeschke 1996). Megfigyelték azt is, hogy az immunonutriens N-3 zsírsavak és antioxidánsok együttes adása mind a plazma foszfolipidjeiben, mind a zsírszövetben szignifikánsan csökkentette az arachidonsavkoncentrációt, növelte az eikozapentaénsav és dokozahexaénsav arányát. Az antioxidáns terápia javította az antioxidáns státuszt remisszióban lévő CD betegekben. Az N-3 zsírsavak és az antioxidánsok szignifikánsan megváltoztatták az

eikozanoid-prekurzor mintázatot, és gyöngítették a proinflammatorikus aktivitást. Az eredmények azt erősítették meg, hogy az N-3 zsírsavak és az antioxidánsok potenciális szerepet játszhatnak a CD kezelésében (Geerling 1999, 2000).

Láttuk, hogy az N-3 zsírsavak szerepét számos tanulmány kedvezőnek tartja. Az N-3 zsírsavak alkalmazása azonban nem kívánt mellékhatásokat válthat ki, (eructatio, halitosis, diarrhoea) ezért nagyon fontos a megfelelő dozírozás és ellenőrzés (Beluzzi 2000). A speciális táplálkozás változásokat okozhat az intestinális flórában, és ezen túl az intraluminális proinflammatoricus szubsztanciákban is (Geerling 1999).

Kutatások igazolták, hogy az N-6 politelítetlen zsírsavak oxidációja során képződő transz-4-hidroxi-2-nonenal hozzájárul a vastagbélrák kialakulásához, viszont az olívaolajban található polifenol típusú antioxidánsok védelmet jelentenek a colorectalis rák ellen (Owen 2000).

Az N-3 zsírsavak (GLA, EPA, DHA) adása nem hosszabbította meg a remissziós periódust IBD-ben (Middleton 2002). Szulfaszalazinnal összehasonlítva azt találták, hogy a halolaj fokozta a CU aktivitását, növelte a pH-t, a CRP-szintet, a vérszejtsüllyedést és a fekális nitrogéntartalmat. (Dichi 2000). Ezt az eredményt cáfolni látszik az, hogy EPA hatására csökkent az LTB₄-szint, és csökkenthető volt a szteroidmennyiség a kezelés során (Hawkey 1992). Más kutatócsoport is megerősítette ezt az eredményt, sőt az alacsonyabb szérum LTB₄- és IL-2-szint mellett az NK-sejteitotoxicitás gátlását is megfigyelték EPA és DHA kezelés hatására (Almallah 2000a). Egy hasonló vizsgálatban a CD3-, HLA- és IgM-expresszió csökkenését írták le, melyek a betegség tüneteinek enyhülését eredményezték (Alhallah 2000b). Mások azt találták, hogy az N-6 zsírsavak, és a dihomó- γ -linolénsav szintje csökken a legjobban CU-ban. (Esteve-Comas 1992).

2.3. A nem alkoholos eredetű zsírmáj és steatohepatitis kapcsolata

a szabadgyökös reakciókkal

A máj zsíros elfajulásának több oka lehet. Az alimentáris eredetű zsírmáj a leggyakoribb szövődménymentes májkárosodás. Zsírmáj azonban kialakulhat éhezés kapcsán és fehérjehiányban is. Bizonyos betegségek, mint például a hyperlipidaemia, tuberculosis, diabetes, intestinális bypass műtétek, hasi sebészeti beavatkozások, kiterjedt vékonybél-reszekciók, gyulladásos bélbetegségek, vagy az alkoholizmus vezethetnek zsírmájhoz. A gyógyszerek közül például a szteroid hormonok, glükokortikoidok, amiodaron stb. hasonlóképpen hozzájárulhatnak a máj károsodásához (Stravitz 2003, Vereckei 1992, Ágoston 2003, Fehér 2003).

Zsírmájról, vagy nem alkoholos steatosisról (NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease) akkor beszélünk, ha a máj tömegének legkevesebb 10 %-a zsír. Az egyszerű zsírmáj általában nem társul egyéb abnormalitásokkal, mint például gyulladásos folyamatokkal. Leggyakrabban túlsúly vagy diabetes esetében jelentkezik. A betegség a lakosság 10-24 %-át érinti.

Zsírmájban általában enyhe májenzim-eltérések mérhetők a szérumban. Ultrahangvizsgálattal inhomogén képet kapunk. CT-vizsgálatnál kisebb denzitás látható, mint az egészséges májban.

A zsírfogyasztás önmagában csak kísérletes körülmények között okoz zsíros degenerációt. Saját kutatásaink kapcsán már 1992-ben leírtuk, hogy patkányokban a koleszterinben (2 %) és trigliceridben (20 % napraforgóolaj) dús diéta néhány nap alatt (10-14 nap) súlyos zsírmájat idézett elő (Blázovics 1992). Az embereknél azonban ilyen mértékű zsírfogyasztás nem jellemző. A máj elzsírosodása során lipidperoxidációs termékek jelentek meg (TBARS, diénkonjugátum) és csökkent a máj antioxidáns védelme (Blázovics 1993).

A zsírmáj kialakulásában feltételezik, hogy a zsírtranszfer a máj és a távoli szervek között nem megfelelő, illetve nem zárják ki annak valószínűségét sem, hogy a májban a zsírákkumulációt követően nem történik meg a transzferhez szükséges kémiai módosulás. A zsírfelhalmozódás akkor következik be, amikor a zsírsavak mennyisége meghaladja a mitokondriális zsírsavoxidációhoz szükséges mennyiséget. A zsírsavak megváltoztatják az intracelluláris anyagcserét. A telítetlen zsírsavak befolyásolják a VLDL-koleszterin exkrécióját, aminek következtében megváltozik a glükoneogenezis és az oxidatív foszforiláció üteme.

Általában a zsírmáj nem kíván speciális kezelést. A diéta megszorítása, illetve a diabetes megfelelő kontrollja regressziót eredményez. Állatkísérletekben silibinnel, valamint silibinin és E-vitamin együttes adásával kedvező változásokat értek el (Horváth 1993a, Fehér 1996).

A nem alkoholos steatohepatitis, - melyet 1980-ban először Ludwig és munkatársai jellemeztek (NASH, non-alcoholic steatohepatitis) - azonban jelentősen eltér a szövődménymentes zsírmajtól (Ludwig 1980). A betegség az össznépeség mintegy 2-6 %-ban fordul elő (Te Sligte 2004). Eddigi tanulmányok nem erősítették meg a NASH kapcsolatát más krónikus májbetegségekkel, mit például a hepatitis B és C vírusfertőzésekkel, autoimmun betegségekkel, nem egyértelmű a gyógyszer-toxicitásokkal való szoros összefüggés sem. A réz (Wilson betegség), illetve vas (hemochromatosis) akkumuláció következtében kialakuló májbetegségekkel való kapcsolata sem egyértelmű, bár a Wilson-kór megtalálható a kóroki tényezők között (Fraenkel 2004). Ezek a betegek általában diabetesben szenvedő és/vagy hyperlipidaemiás középkorú nők. A betegség azonban férfiaknál és 9-16 év közötti elhízott gyermekeknél is előfordul (Bergman 2000). A betegség hosszú időn, akár 20 éven keresztül rejtve maradhat. Gyakran a hirtelen súlyvesztés, rossz közérzet és jobb bordaív alatti fájdalom hívja fel rá a figyelmet. A betegek közel 40 %-ban fibrosis, 5-10 %-ban cirrhosis figyelhető meg. Prediktív tényezők a hypertonia, az inzulinrezisztencia, az alanin-aminotranszferáz magas értéke, a hypertriglyceridaemia és a hypercholesterolaemia, bár az irodalom szerint nem feltétlenül jellemzi a magas szérumglükóz- és szérumkoleszterin-érték. A betegségre jellemző, hogy a szérumban az aszpartát-aminotranszferáz érték kisebb az alanin-aminotranszferázénál, ami alkoholos májbetegség

esetében ellenkező. Az alkalikus-foszfátáz szérumszintje enyhén emelkedett, és csak a betegek egyharmadában jelentkezik. A NASH-ban szenvedő betegekben a ferritin mennyisége a vérben jelentősen megnő, de ennek pontos mechanizmusa még nem tisztázott (Dixon 2001).

A diagnózis felállításánál az egyéb betegségek kizűrése után a képalkotó eljárások mellett a biopszia nyújt segítséget. A nem alkoholos steatohepatitis szövettani képe a májparenchyma gyulladásos infiltrációját mutatja, a hepatociták nekrozisa és ballonszerű degradációja figyelhető meg. A súlyosabb formákban perivenularis, perisinusoidális vagy periportális fibrosis látható. Mallory-féle hialintestecskék, glikogéngranulátumok, Councilmann-testecskék, lipogranulomák és vaszárványok mutathatók ki (Fraenkel 2004).

A NASH patogenezisével kapcsolatban egy elfogadható „kétfázisos” hipotézis ismert. Az első fázis szerint a szénhidrátban és telített zsírsavakban bő, nagy kalóriaértékű diéta eredményezi a vérplazma megemelkedett szabadzsírsav-szintjét, ami kiterjed a zsírszövetre is. Kialakul az inzulinrezisztencia és ezáltal fokozódik a steatosis. A második fázisban a szabad zsírsavak oxidációja lipidperoxidációt okoz, melynek következtében fokozódik az oxidatív stressz a hepatocitákban és proinflammatorikus citokinek keletkeznek. Amikor az antioxidáns kapacitás elégtelen, vagy kimerül, a mitokondriális diszfunkció, illetve a TNF- α gyulladást provokál, illetve következményes fibrosis alakul ki (Itoh 1987). A gyulladásos folyamatokban a Kupffer-sejtek és az Ito-sejtek aktivációja figyelhető meg. A Kupffer-sejtek aktiválódását követően megindul a citokinek termelése. A csillagsejt-myofibroblast átalakulást a citokinek, a TGF- 1β , a PDGF és az endotelin kezdeményezik (Schmidt 1993).

A betegek táplálkozási szokásainak jelentős változtatásán, illetve a diabetes kezelésén és a lipidszintek csökkentésén túl a NASH esetében még nem alakult ki specifikus kezelési ajánlás. A NASH kezelésében eddig sikerrel alkalmazták a metformint, rosiglitazone-t és pioglitazone-t, valamint az E-vitamint. Urzodezoxikólsav, betain, N-acetilcisztein és metadoxin kezelés hatására szintén javultak a májenzim-értékek (Lindor 2004, Te Sligte 2004, Fehér 2003, 2004).

2.4. Az alkoholos zsírmáj kialakulása és a szabadgyökös reakciók szerepe az alkohol metabolizmusában

Az elfogyasztott alkohol mennyiségének jelentős szerepe van az alkohol által okozott májbetegségek kialakulásában. A nők szignifikánsan érzékenyebbek az alkohol okozta oxidatív károsodásokkal szemben. A nők cirrhosis-kockázata megközelítően háromszor nagyobb a férfiaknál (Argawal 1997, Blázovics 1999, Bosron 1988, Groenbaeck 1995, Hagymási 2001, Harada 1990, Mizoi 1994). Az alkoholfogyasztás velejárója a folát, tiamin és más vitaminok hiánya. Csökken a szervezet antioxidáns molekuláinak mennyisége. A májban raktározódó A-vitamin, ill. közvetlen prekursora a β -karotin is károsodik. A másodlagos malabszorpció a

gasztrointestinális komplikációk következménye. Ilyen komplikáció a pancreas-insufficiencia, a sérült táplálékhasznosítási hepaticus metabolizmus, és maga az alkohol direkt tápanyagkárosító hatása (Degrell 1980, Lieber 1990, Lieber 1997, Leo 1993).

A mértéktelen alkoholizálás eredményeképpen különböző súlyosságú májelhváltozások jönnek létre, az alkoholos zsírmáj, az alkoholos hepatitis és az alkoholos májcirrhosis. Számos adat megerősíti az alkohol szerepét a primer hepatocelluláris carcinoma kialakulásában. Az alkohol direkt eliminációja 2-10 %-ban a tüdőkön és a veséken keresztül valósul meg. Az alkohol csak jelentéktelen mennyiségben metabolizálódik a gyomorban és a bélben, a metabolizmus legfontosabb helye, megközelítően 90 %-ban a máj. Az alkoholos hepatitisből kialakulhat diffúz interstitialis fibrosis és májcirrhosis is. A máj struktúrájának teljes átépülése végül a beteg halálához vezet (Koivisto 1996, Lieber 1997, Meyer 1996).

A szövettani változások hátterében számos metabolikus eltérés figyelhető meg, amely a redoxi-státuszban bekövetkező durva eltérésben jelentkezik, és szoros kapcsolatban van az alkohol által okozott oxidatív stresszel (Horváth 1992, 1992a, Lewis 1992, Lieber 1997a, Nordmann 1996).

2.4.1. Az alkohollebontás biokémiája

Az etanol a májban három fő metabolikus úton át alakul acetaldehiddé. A citoszolban az alkohol-dehidrogenáz, a mikroszómában az indukálható mikroszomális etanol oxidáló enzim (MEOS) és a peroxiszómákban a kataláz vesz részt az átalakításban (Lieber 1975, 1997, Meyer 1996). Súlyos alkoholos mérgezésben, vagy idült alkoholizmusban ismert egy nem specifikus metabolikus út is, a zsírsavak direkt észterezése (Bora 1996, Dan 1997, Groenbaeck 1995, Laposata 1986). Az alkohol-metabolizmusa során primer és szekunder szabadgyök-képződés figyelhető meg (Horváth 1992, 1992a, Lewis 1992, Lieber 1975, Lieber 1997, Nordmann 1996). Az alkohol abszorpciójának és eliminációjának kinetikájáért a citoszolban található alkohol-dehidrogenáz (ADH) és a mitokondriális aldehid-dehidrogenáz (ALDH) izoenzimeket kódoló gének polimorfizmusa a felelős. Az egyes izoenzimek megjelenése, aktivitása vagy hiánya jelentős eltéréseket okoz az alkohol iránti érzékenységben (Bosron 1986, 1993, Whitfield 1997). Az ADH2, ADH3 és ALDH2 allélok által kódolt enzimek kinetikai tulajdonságaiban jelentős különbségek mutatkoznak. Eddig egyértelmű, meggyőző bizonyíték az ALDH polimorfizmus és a májbetegség között volt (Tsuritani 1995).

Az acetaldehid, az etanol első oxidációs derivátuma. Az erősen mérgező metabolit gyorsan átalakul acetáttá a mitokondriális ALDH hatására. A gyors átalakulást az alacsony K_M érték teszi lehetővé. Az enzim aktivitása szignifikánsan csökken krónikus alkoholistákban. Az acetaldehid toxicitás abban nyilvánul meg, hogy az acetaldehid fehérjékkel képzett vegyülete inaktív enzimeket eredményez, autoantitestek képződnek, valamint gátlódik a DNS repair-mechanizmus.

Az acetaldehid felgyorsítja a glutation (GSH) kiürülést, a szabadgyök-mediált toxicitást és a lipidperoxidációt. Az acetát egy részéből acetyl-CoA keletkezik, amely belép a citrátciklusba, ill. részt vesz a lipidképzésben. Az acetát nagyobbik része a véráramlás útján a perifériás szövetekben széndioxiddá és vízzé ég el (Calabrese 1998, Dan 1997, Worral 1991, 1993, Yoshida 1992).

Eddig 12 aldehyd-dehidrogenáz gént azonosítottak. E gének különböző kromoszómákon lokalizálódnak és azokat az enzimeket kódolják, amelyek az alifás és aromás aldehidek számosát képesek oxidálni. A metabolikus eltérések, melyek klinikai tünetekkel is jelentkeznek, az ALDH1, ALDH2, ALDH4, ALDH10 és az SSDH (szukcinil-szemialdehyd) génekhez társulnak (Harada 1990, Tsuritani 1995, Yoshida 1998). Az ázsiai lakosság megközelítően 50 %-ában hiányzik az ALDH2 izoform.

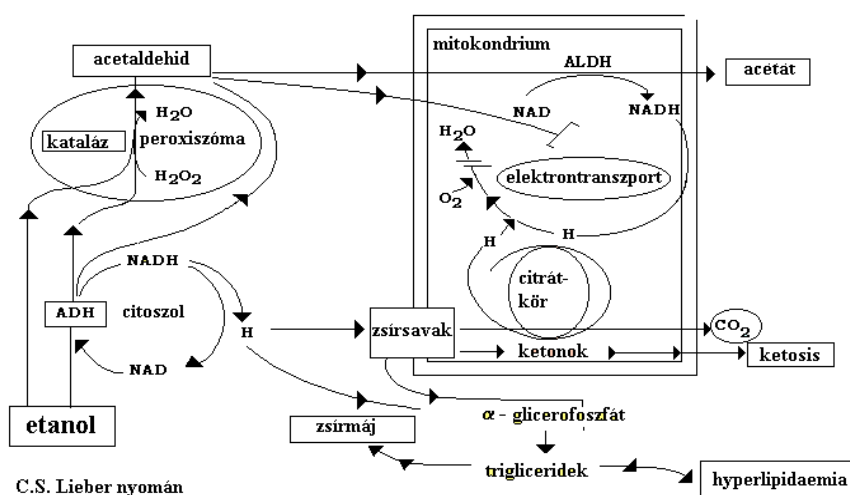
A humán I. osztályú ADH a gastrointestinalis traktusban is kimutatható a mucosa epithelialis sejteiben. A felsőbb bélszakaszokban sex- és korfüggő eltéréseket kaptak, míg a colonban már nem voltak szignifikáns különbségek az ADH és ALDH aktivitásokban.

A tápcsatornában különböző mértékben működnek az ADH és ALDH izoenzimek, és ennek megfelelően károsodik a mucosa (Liao 1991, Smith 1986, Wong 1989, Yin 1993, 1994, 1997, Yoshida 1994, Wang 1993).

A kataláz képes *in vitro* az alkoholt oxidálni hidrogén-peroxid jelenlétében. Azonban a kataláz *in vivo* szerepe mégsem az alkohol bontása. Ez abból is kitűnik, hogy acatalasaemiában a betegek tünetmentesek. A kataláz által termelt hidrogén-peroxid azonban hozzájárulhat a zsírsavak β -oxidációjához a peroxisómákban. Bár a peroxisómákban a rövid szénláncú zsírsavak oxidációja nem lehetséges, mégis ADH-hiányban megfigyelhető volt az oktanoát oxidációja (Lieber 1997). Az 5. ábrán az etanol oxidációját mutatom be a hepatocitákban.

5. ábra.

Az etanol oxidációja a hepatocitában; ADH - mediált NADH-képződés



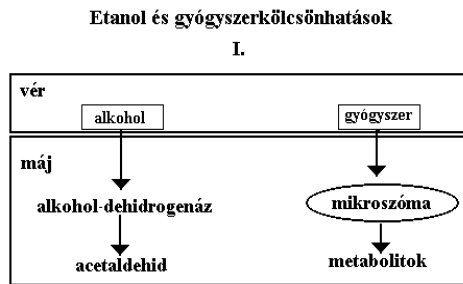
2.4.2. A mikroszomális alkohol- és acetaldehid-metabolizmus

A krónikus alkoholistákban a mikroszomális alkohol, ill. acetaldehid metabolizmus is szerephez jut. Az alkoholok és az acetaldehid oxidációjában a citokróm P450 izoenzimje, a CYP2E1 vesz részt, amely enzim akkor indukálódik, amikor az alkohol nagy mennyisége és/vagy az alkoholizmus fennállási ideje miatt az alkohol lebontása már nem történik meg fiziológias körülmények között (Takahashi 1993, Kunitoh 1997). Ismert a CYP2E1 genetikai polimorfizmusa is (Hu 1997).

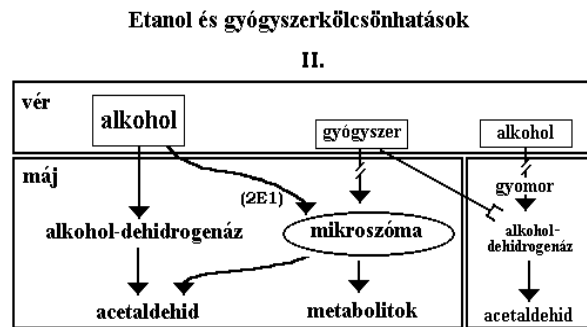
Az alkoholból hidroxil- és etoxil-gyökök keletkeznek. A xenobiotikum-transzformáció fokozza a mikroszoma szabadgyök-termelését és ezáltal károsítja magát a mikroszomális enzimrendszert is. A CYP2E1 indukciója hatással van a máj oxidatív károsodására, mivel az etanol a méregtelenítés során képződő H_2O_2 -vel reakcióba lépve 1-hidroxietil szabad gyököt képez. Az 1-hidroxietil szabad gyök emberben is keletkezik. Az 1-hidroxietil szabad gyök és a malondialdehid fehérjével képzett adduktjai immunreakciókat váltanak ki. Az IgG reaktív hidroxietil-fehérje addukt azonban nem jelenik meg azokban az alkoholistákban, ahol a CYP2E1 indukció hiányzik. A malondialdehid-fehérje addukt ellen termelődő IgG viszont megjelenik akkor is ha indukálódik a CYP2E1 és akkor is, ha nem jön létre indukció. Az 1-hidroxietil szabad gyök képződése hozzájárul az alkoholos májbetegség kialakulásához (Dupont 1998, Koivisto 1996, Rao 1996). A 6., 7., 8., és 9. ábrán az alkoholfogyasztás hatására történő CYP2E1 indukció fázisai láthatók.

6. ábra

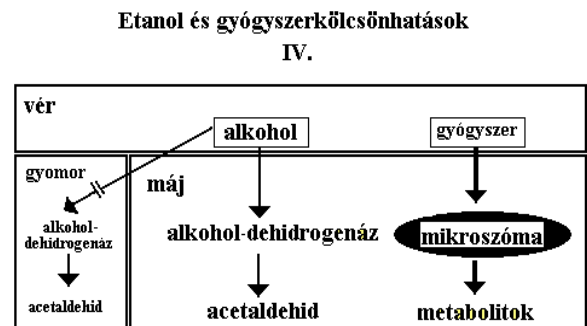
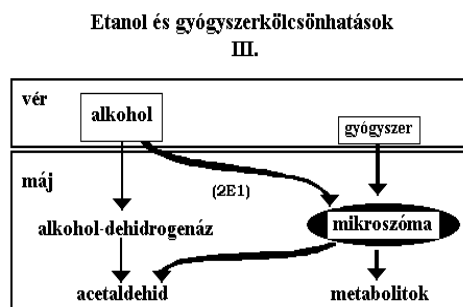
7. ábra



8. ábra



9. ábra



C.S. Lieber nyomán

Kismértékű alkoholfogyasztás nem indukálja a CYP2E1 enzimet, azonban nagymértékű italozás vagy alkoholizmus hatására az izoenzim fokozottan szintetizálódik, akár 10-szeresére is megnövekedik a koncentrációja (Ingelman-Sundberg 1993).

A lipidperoxidáció fokozódik, ha az alkohol mellett jelentős a gyógyszerfogyasztás, ill. párhuzamosan xenobiotikum-konverzió zajlik. A xenobiotikumok direkt károsító hatása alkohol jelenlétében fokozódik és így maga a májmikroszóma gyorsan degradálódik (Dupont 1998, Fraser 1997, Horváth 1992 a, 1994, 1994a).

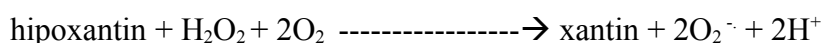
A kaukázusi populációban eddig a CYP2E1 négy különböző típusát írták le (Lieber 1997, 1997a, Wong 2000). Fontos tudni, hogy az I. osztályba tartozó ADH az alkoholok széles skáláját képes katalizálni. Ez az enzim metabolizálja az A-vitamint is. A retinsav pozitív feed back hatást fejt ki az ADH-ra. A májban raktározódó A-vitamin, ill. közvetlen prekursora a β -karotin is károsodik alkohol hatására (Waladkhani 1997, Yoshida 1992).

2.4.3. Redox-homeosztázis alkoholizmusban

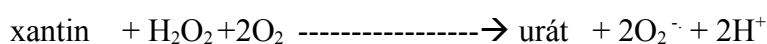
Alkoholizálás során a mitokondrium inkább redukálttá válik, amely mérhető a β -hidroxibutirát $\rightarrow$ acetoacetát átalakulással. Az eltérő redoxi-állapot felelős a különböző metabolikus eltérésekért. Mivel a NADH/NAD arány nő, ezért a zsírsavoxidáció mértéke csökken és a máj elzsírosodása figyelhető meg. A megnövekedett NADH/NAD arány megemeli az α -glicerofoszfát koncentrációját is, amely kedvez a hepatikus triglicerid akkumulációnak a

zsírsavak megkötésével. A NADH fokozza a zsírsavszintézist. A NADH megnövekedett koncentrációja befolyásolja a 3-hidroxivajsav, vagy más néven ketontest képződését is. A ketontestek megjelenése a pH-t jelentősen eltolják savas irányba, ezzel hozzájárulnak az acidosis kialakulásához (Yamanaka, 1996). Hypoglycaemia alakulhat ki a krónikus májbetegségek terminális fázisában. A hyperlactacidaemia összefügg az acidosisal és ezáltal csökkenti a vesék kapacitását, csökkenti a húgysavürítést, ami secunder hyperuricaemiához vezet. Az alkohol-indukált ketosis és a fokozódó purinanyagcsere zavar gyorsíthatja a hyperlipidaemia kialakulását (Wrenn 1991, Yamanaka, 1996, Yin 1997). Zavaró tényező továbbá, hogy a purindegradáció fokozódása miatt a xantinoxidáz enzim oxigén szabad gyököket termel (Sanhueza 1992).

xantinoxidáz



xantinoxidáz



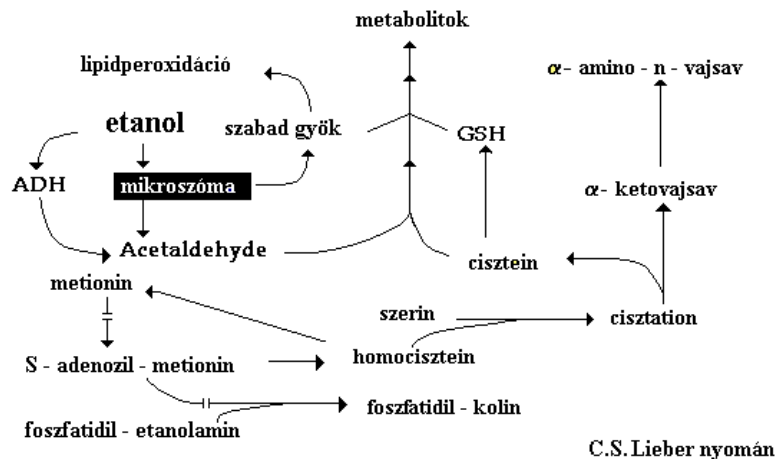
A húgysav termelése eredményesen csökkenthető allopurinollal, ami a hipoxantin szerkezeti analógja és a xantinoxidáz működését gátolja, ezáltal csökkenti a lipidperoxidáció veszélyét. A nagymértékű alkoholfogyasztás azonban meggyorsítja a köszvényes roham kialakulását.

További probléma, hogy a xantinoxidáz az alkohol lebontása során keletkező acetaldehidet is képes metabolizálni. Az acetaldehid xantinoxidáz vagy aldehid-oxidáz által katalizált in vitro metabolizmusa szabad gyökök keletkezéséhez vezet. Az irodalom azonban nem egységes annak megítélésében, hogy in vivo körülmények között ez a reakcióút valóban jelentős szerepet játszik-e a szabadgyök-képzésben (Fehér 1987, Kato 1990). Alkoholizmusban növekszik a máj lipogenezise. Csökken a máj lipoprotein release és nő a perifériás zsír mobilizációja. Fokozódik a cirkuláló lipidek felvétele a májba, ugyanakkor csökken a zsírsavak oxidációja (Lieber 1997). A GSH-depléciónak következtében az acetaldehid hozzájárul a lipidperoxidáció indukciójához. Mivel az alkoholisták vitaminkészlete kimerül, így a GSH regenerációját biztosító E-vitaminszint, valamint az E-vitamin redukciójához szükséges koantioxidáns, a C-vitamin koncentrációja is csökken. A súlyos alkoholisták étrendjéből hiányoznak a zöldségfélék és gyümölcsök is, így hiányt szenvednek a máj természetes antioxidáns védelmében szerepet játszó flavonoid- és flavonolignán származékokban, bár ezek az antioxidánsok a vörösborokban jelentős koncentrációban vannak jelen. A természetes antioxidáns molekulák hiánya elsődlegesen a diénkonjugátumok kialakulásához, oxidált lipidek létrejöttéhez, tiobarbitursav reaktív anyagok megjelenéséhez és a membránstruktúrák károsodásához vezet. A májfunkció romlásával együtt jár az enzimatisz antioxidáns védelem és a degradátumokat eltakarító, valamint a funkciókat helyreállító, javító mechanizmusok károsodása is (Fehér 1987a, Horváth 1992, 1992a, Lugasi 1997, 1999).

A 10. ábra az alkoholtotoxicitás kapcsán felerősödő lipidperoxidációhoz vezető biokémiai utakat jelöli.

10. ábra.

A fokozott acetaldehid-termelés növeli a szabadgyök-képződést és a lipidperoxidációt



Krónikus alkoholizmusban felgyorsul a hepatociták vasfelvétele. A vas központi szerepet játszik a lipidperoxidáció iniciálásában és propagációjában (Fehér 1987, Beilby 1992). Így jelentős szerepe van a következményes szöveti nekrozis kialakulásában és a kollagén-képződésben. A lipidperoxidációt gátló glutation gyorsan kiürül a májból. Ennek oka, hogy a glutationt alkotó cisztein szintéziséhez nem áll rendelkezésre elegendő metionin, mivel a cirrhoticus májban a metionin aktivált formája az S-adenozil-metionin koncentrációja jelentősen lecsökken, így a GSH-utánpótlás lelassul. S-adenozil-metionin (fő metiláló ágens) hiányában azonban számos más létfontosságú metabolikus út aktivitása is lecsökken. Az S-adenozil-metionin, mint metilcsoport-donor rendkívül fontos a fehérjeszintézisben, a catecholaminok és a nukleinsavak szintézisében. Befolyásolja a membránok szerkezetének kialakulását és fluiditását, mivel részt vesz a foszfatidil-etanolamin és a foszfatidil-kolin metilálásában. Alkoholistákban csökken a foszfatidil-etanolamin-metiltransferáz aktivitás, mely befolyásolja a máj foszfolipid-szintézisét. Hiányával magyarázható az alkoholos májbetegségben tapasztalható membránkárosodás. Ezért a foszfolipidekben gazdag étrend és az esszenciális zsírsavak fogyasztása biológiailag hasznos lehet alkoholos cirrhosisban. (Fehér 1987, Finkelstein 1986, Lieber 1990, 1997).

A 11. összefoglaló ábra szemlélteti az alkohol lebomlásának útját a szervezetben és az alkoholizmus következményeit (ábra)

11. ábra

polimorfizmusa miatt az IL-10 (627*pozíciójú A allél / ATA haplotípus) szekréciója csökkent, ez is hozzájárul a fibrotikus máj kialakulásához. (Grove 2000. Fiorentino 1991, Taga 1992).

Ismertté vált, hogy az alkohol gátolja a leukotriének ω -oxidációs degradációját is, melynek oka a megemelkedett NADH koncentráció (Baumert 1989).

2.5. Szabad gyökök és epeköbetegségek

Az 1990-es évek különböző egészségügyi statisztikai elemzései szerint az USA-ban és Németországban a lakosság mintegy 15 %-a szenvedett epeköbetegségben. Az USA-ban az afro-amerikai populációban megközelítően 50 %-kal kevesebb volt az epeköbetegség, mint a nem-spanyol eredetű fehérekben, ellentétben a bennszülött indiánokkal, ahol a gyakoriság igen nagy volt. Az ötven év feletti fehér nők közel $\frac{1}{4}$ -ében alakult ki epekő (Trotman 1985).

Európában az össz-lakosságot tekintve 10-40 % közötti az epekövesség előfordulása. A férfiak és a nők megbetegedésének aránya 1:2-3. A kaukázusi populációban a nők 5-10 %-a 50 év alatt, 25 %-a 50 év felett betegszik meg epekövességben. Ez az arány férfiakban 50 év alatt 4-10 %, 50 év felett 10-15 %-ra módosul. Az arizonai pima indián nők 70 %-a már 25 éves kor alatt epeköbeteg. A koleszterinkő képződéséért felelős gének prevalenciája rendkívül nagy a chilei indiánokban. A mapuche-okban 100 %-os a mtDNS haplotípus előfordulása, a spanyol fehérekben 88 %, míg a maori emberekben nem található epekövességre hajlamosító genetikai eltérés. Az epeköbetegség Afrikában és Ázsiában igen ritka.

A koleszterinkő 70-90 %-ban, a barnakő 10-20 %-ban, a feketekő 5-30 %-ban fordul elő. Japánban a haemolyticus anaemiával összefüggő bilirubinkő a jellemző. Egy tanulmány alapján 43 %-ban fordul elő epekő haemolyticus anaemiában, míg sarlósejtes anaemia esetén ez az arány 100 % (Attili 1995, Murhbeck 1995).

Saját korábbi vizsgálatainkban random választott 526 gasztrointesztinális betegségben szenvedőből (261 nő és 265 férfi) 145 volt epeköbeteg. A betegek között 105 nő és 40 férfi volt. E betegcsoportban 12,83 %, azaz 18 fő volt inzulinnal kezelt diabeteses. A férfiak és a nők aránya 1:2 volt a diabeteses epeköves csoportban (Abdel Rahman 1996).

Hazánkban is sokan betegszenek meg epekövességben. Egy 1998-as felmérés szerint, abban az évben 24312 cholecystectomy történt Magyarországon (Besznyák 2000).

Az epeelfolyási és képződési rendellenességekben és a különböző etiológiájú betegségekben, mint például a hyperlipidaemia, gluten-sensitiv enteropathia, ileum-resectiot követő állapot, Crohn-betegség, diabetes mellitus, obesitas, gyógyszerek mellékhatásai (Clofibrate) gyakoribb az epekő előfordulása (Cohen 1985 Carey 1988, Trotman 1985).

Az epeköbetegség magas százalékos aránya a gazdaságilag fejlett országokban leginkább a helytelen táplálkozási szokásokkal, így a zsírbő és rostszegény étrenddel, valamint a

rendszeretlen étkezéssel függ össze. A kövek gyakran előforduló kísérőjelensége a hólyagfal steril inflammációjára, mely folyamat során aktiválódik az arachidonsavkaskád, felerősödik a mucin-szekréció és állandósul a szabadgyök-szivárgás. A szabad gyökök szerepe a kőképződés folyamatában intenzíven kutatott terület (Abdel Rahman 1995, Blázovics 1997a,b, 2002, Sipos 1997, 2003, Szentmihályi 2002,).

A máj struktúrájának és funkciójának megváltozásakor szignifikánsan változik az epe összetétele és a biliáris passage. A koleszterin-szuperszaturáció, az epehólyag-hipomotilitás, a mucin-hiperszekréció, valamint a hólyagfal gyulladásos folyamatai váltják ki a kőképződést.

Az exogén arachidonsav-lecithin stimulálja az epehólyagfal gél-mátrixot és gyorsítja fel a nukleációs folyamatot (Carey 1988). Az epe szuperszaturációja a Ca-hidrogén-bilirubináttal stimulálja a pigmentkőképződést. A barna és fekete pigmentkövek nagy mennyiségben tartalmaznak mono - és egyszeresen konjugált bilirubin IXa-t. A bilirubin hiperszekréciója a haemolyticus folyamatok és az enterohepaticus körforgalom eltérései miatt hozzájárul a pigmentkő képződéshez (Sharid 1978, Trotman 1985, Nakao 1988). A barna pigmentkövek képződésében megközelítőleg 100 %-ban bakteriális infekciók játszanak szerepet. A bakteriális β -glükuronidázok a konjugált bilirubint hidrolizálják (Trotman 1985). A bilirubin a hem katabolizmus végterméke, amely a hemoglobin, mioglobin és számos respiratorikus enzim lebomlásakor képződik. A bilirubin a reticuloendothelialis sejtekben képződik. A bilirubin szerkezete (6 intracelluláris hidrogén-híd) következtében alig oldódik vízben. Oldhatósága savas vagy lúgos pH-n jelentősebb (Bonnett 1976).

A potenciálisan toxikus bilirubin a plazmában albuminhoz kötődve szállítódik. A konjugált bilirubin glukuronsavval észterifikálódik a májmikroszómákon. A bilirubin xilóz-, szulfát- és glükóz-konjugátumai is ismertek, melyek kimutathatók cholestasisban (Chowdhury 1983).

A szabad bilirubinmolekulák közvetlenül a mikroszómákról jutnak az epébe. Pozitív korreláció figyelhető meg a bakteriális β -glükuronidáz enzimaktivitás és a szabad bilirubin koncentrációja között. Cholangitisben a pH savasabbá válik, így az jobban közeledik a β -glükuronidáz optimális működéséhez szükséges pH értékhez. A biliáris traktus epitheliumában kialakuló aerob és anaerob bakteriális infekció hozzájárulhat az epekőképződéshez (Nakao 1988, Okta 1992). Az *Escherichia coli* és a *Clostridium perfringens* β -glükuronidáz aktivitása oka lehet az epevezeteket elzáró kő képződésének (Vitetta 1992). A bakteriális infekciók okozzák az akut cholestasist intravénásan táplált újszülöttekben (Wolf 1989). A szabad bilirubin a zsírsavmetabolizmussal is interferál (Bayes Garcia 1989). A telítetlen zsírsavak fogyasztása növeli az epekő-rizikót (Cohen 1985).

A bilirubin kemilumineszcens reakciója figyelhető meg triplet oxigén jelenlétében és a jel stimulálható aldehiddel (Watanabe 1992). A bilirubin ismert fotodinamikus ágens, amely O_2 -ből

fény hatására szingulett oxigént ($^1\text{O}_2$) termel. A bilirubin szabad gyök formáját ESR technikával is igazolták. A bilirubin szabad gyök regenerációja nulladrendű kinetikát követ (Yang 1992). A bilirubin-hidroperoxid elsődleges emitter (Watanabe 1992a). Lineáris korrelációt kaptak a szabadgyök-szignál amplitudója és a paraffinba ágyazott májszövet minták epe-klasztjainak ESR-spektruma között az azonos blokkokban. Ez a jelintenzitás lineáris korrelációt adott a minta Ca-bilirubinát koncentrációjával (Shen 1996).

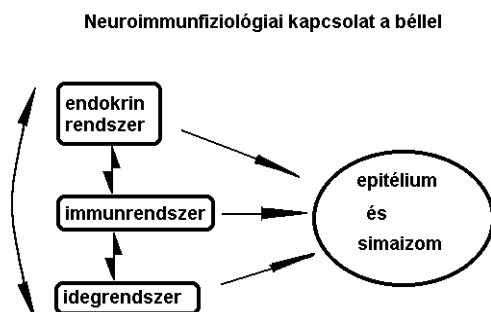
A bilirubin antioxidáns tulajdonságát is igazolták. A konjugált bilirubin mikromolos koncentrációban képes gátolni a polimorfonukleáris leukocita által kiváltott luminol-dependens kemiluminescenciát. A bilirubin képes semlegesíteni a peroxilgyököket is. 2 %-nál kisebb oxigénkoncentrációnál liposzómában a bilirubin jobban véd a lipidperoxidáció ellen, mint az α -tokoferol (Stocker 1987, 1989).

Véletlen felfedezés vezetett annak bizonyításához, hogy a szabadgyökös folyamatok fontos szerepet kapnak az epekőbetegség kialakulásában. Cholecystectomián átesett betegek epehólyagjából nyert epeváladék kemilumineszcenciás vizsgálata azt mutatta, hogy bizonyos betegekből nyert kísérleti minták fokozták a hidrogén-peroxid/hidroxil gyök – luminol fényreakciót. Az epék további vizsgálata során diénkonjugátum és tiobarbitúrsav reaktív termékek jelenléte igazolódott (Blázovics 1994, 1996a, Abdel Rahman 1995, 1996). Modell-epében történő vizsgálatokkal egyértelművé tették, hogy az epehólyag falában zajló gyulladásos folyamatokban képződő szabad gyökök elősegítik az epekőképződést (Eder 1996). A Fe^{2+} -EDTA + aszkorbinsavval kiváltott lipidperoxidáció termékei, a 4-hidroxi-2,3-transz-nonenal- és a malondialdehid-koncentráció növekedését hozták összefüggésbe a nukleáció időbeli felgyorsulásával, különös jelentőséget tulajdonítva a $\cdot\text{OH}$ -gyökök szerepének. A nukleációs idő növelhető volt, a lipidperoxidációt gátló scavenger BHT és a komplexképző desferal jelenlétében. Christian és mtsai (1996) azt tanulmányozták, hogy milyen szerepet játszhat a metionin, ill. a taurin az epekőképződés meggátlásában, és azt találták, hogy a metionin kutyákban védelmet biztosít a kőképződés ellen.

2.6. Redox-homeosztázis gyulladásos bélbetegségekben

A colitis ulcerosa és a Crohn-betegség incidenciája nagy (1:1000) a nyugati társadalmakban (Rhodes 2002). A gyulladásos bélbetegségek etiológiája még napjainkban sem tisztázott. Az IBD kialakulásában a genetikai determináltságon túl fontos szerepet játszanak a neuro-endokrin szabályozásban és az immunfolyamatokban bekövetkező változások, valamint a mikroorganizmusok (Nemetz 2001, Nielsen 1996, Pavlick 2002). Mindkét betegségben körülbelül ötszörös a daganatok kialakulásának kockázata a kontrollpopulációhoz viszonyítva, és

ez tartós remisszióban is megmarad, bár az irodalom e tekintetben nem egységes (Butt 1980, Rhodes 2002). A krónikus gyulladásos bélbetegségek gyógyítása annak ellenére nem megoldott, hogy számos antioxidáns típusú, és molekuláris biológiai készítmény áll rendelkezésre (Goncalves 1998, Sandborn 2003). A gyulladásos bélbetegségek korai felismerése és a betegség



súlyosságának megítélése tehát nagyon fontos a betegek életkilátása szempontjából (Szilvás 2003, Szilvás 2002). A 12. ábra azt mutatja, hogy a bélműködés szabályozásában az endokrin-, az immun- és az idegrendszer egyaránt részt vesz.

12. ábra.

2.6.1. Szabad gyökök szerepe IBD-ben

A szabad gyököknek jelentős szerepet tulajdonítanak a gyulladásos folyamatokban, így az IBD patomechanizmusában is. Például a leukociták DNS károsodását jelentősen nagyobb mértékűnek találták e betegekben, mint egészségesekben, amit a 8-hidroxi-deoxi-guanozin koncentrációjának növekedése jelzett. Ennek okát többek között abban látták, hogy a plazma A-, E-vitamintartalma és a karotinok koncentrációja szignifikánsan kisebb volt, mint a kontrollpopulációban. Ezeket az adatokat összefüggésbe hozták a betegek malnutritiójával, a szignifikánsan kisebb fehérje-, zöldség- és gyümölcsfogyasztással (D'Odorico 2001).

Az irodalomban azonban eltérő vizsgálati eredményekről számoltak be IBD-ben a szabadgyök-károsodásokat jelző malondialdehid (MDA) koncentrációértékek és az antioxidáns védekező mechanizmusok összehasonlításakor. Korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy mind a CU, mind a CD betegek bélmucosa szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitása csökkent a betegség fennállásának ideje alatt (Buffinton 1995, 1995a, Mulder 1994). Sturmiolo és munkatársai azt találták, hogy IBD-ben a mucosa glutation-peroxidáz (GSHPx) aktivitása nőtt a kontrollkéhez képest (Sturmiolo 1998). Mások lényeges különbséget mutattak ki az antioxidáns védelmi mechanizmusban, de nem tudták igazolni a fokozott lipidperoxidációt (Bhaskar 1995). Tüzün munkacsoportja a várttól eltérően a betegek plazmájában mért nagyobb antioxidáns enzimaktivitásokat, amit kompenzatorikus jelenséggént értelmeztek. A MDA a kontrollhoz képest nem nagyobb koncentrációja pedig azt tükrözné, hogy a szabad gyökök eliminálódtak, mielőtt még beindították volna a lipidperoxidációs láncreakciót (Tüzün 2002). Voltak, akik megerősítették a növekvő oxidatív stresszt és a csökkent antioxidáns védelmet IBD-ben. Mások alacsonyabb GSHPx-szinteket találtak Crohn-betegekben és nem találtak a mucosában oxidatív sztreesszre utaló eltéréseket. E vizsgálatok azonban minden esetben megfelelő kezelésben

részesülő betegeknél történtek, így csak a mélyebb, molekuláris biológiai kutatások eredményeinek ismeretében lehet az előbbi ellentmondásokat megérteni (Hertervig 1994, Pavlick 2002).

A gyulladásos folyamatokban az indukálható COX2 enzim megjelenése gátolja az apoptózist és fokozza az angiogenezist, így mindkét úton fokozódik a rák kifejlődésének lehetősége (Pavlick 2002). Ma még nem tisztázott, hogy melyik sejttípus felelős a prosztataaglandinok megjelenéséért, bár a cancerosus epithelialis sejtekben a COX2 túlzott képződése megfigyelhető (Rhodes 2002).

A COX2-bénító NSAID készítmények csökkentik a polipok számát familiáris adenomatosus polyposisban. Több tanulmány igazolta, hogy az 5-ASA (5-aminoszalicilsav) mind a ciklooxygenáz, mind a lipoxigenáz gátlásával képes a betegek nagy százalékában csökkenteni a rákrisikót (Kruis 2003, Rhodes 2002). A terápiában alkalmazott 5-aminoszalicilsav (5-ASA), szulfasalazin, 4-ASA, olszalazin szuperoxid scavenger tulajdonságú. Az 5-ASA és a benzalazin hidroxilgyököt is képes scavengelni (Goncalves 1998). Ezek a gyógyszerek biztosítják az antioxidáns védelmet a kimerült bélmucosában. A gyulladásos bélszakaszokból vett biopsziák urát-, glutation-, ubikinon-10-koncentrációk szignifikánsan kisebbek, mint az ép bélszakaszokból származó mintáké CD-ben és CU-ban. Az aszkorbinsav-koncentráció szintén kisebb, amit azzal magyaráznak, hogy a GSH/NADPH-függő dehidroaszkorbinsav- reduktáz aktivitása csökken a glutationdepláció és redukált kofaktorhiány miatt, így az nem képes az aszkorbinsavat visszaalakítani aktív formájába. Érdekes viszont, hogy az α -tokoferolszint nem mutat eltérést a kontrollértékhez viszonyítva (Blázovics 2000). A glutation-S-transzferáz μ , scavenger izoenzim-gén expressziója a populáció közel felében alacsony frekvenciájú. Az alacsony frekvencia jellemző mind CU-ban, mind CD-ben (Hertervig 1994). Ezek a megfigyelések összefüggenek azokkal a diagnózisokkal, amelyek colectomiához vezetnek. A beteg bélszakaszok SOD és kataláz aktivitásai azonban nem változnak IBD-ben (Blázovics 2000, Buffinton 1995, 1995a).

1999-ben számoltak be először a Nature-ben egy olyan gp91^{phox} homológrol, amely a colon epithelsejtjeiben található (Suh 1999). Ez a transzmembrán enzimkomplex egy olyan fehérjecsaldhoz tartozik, amelynek jelenleg 7 tagját sikerült azonosítani. A colonban lokalizált NOX1 szuperoxidaniont termelő oxidáz, hasonlóan a granulocitákban található NAD(P)H oxidázokhoz, központi egységében heme-t tartalmaz. Működése során a NADPH-ról szállít elektront az oxigénre. Ez az enzim a család többi tagjához hasonlóan konzervatív régiókat tartalmaz, mely a törzsfejlődés során nem változott. Hem-kötőrégióval és FAD, valamint NADP kötőhellyel rendelkezik. Eddig megismert alegységei a p22^{phox}, p41 és p51 fehérjék. A NOX izoformok expressziója megnő különböző tumorokban. Az enzimkomplex valószínűsíthetően a bélben található mikroorganizmusok elleni védelmet biztosítja. Szerepe lehet gyulladásos bélbetegségekben is, ezért intenzív kutatásokat folytatnak e területen (Perner 2003).

2.6.2. A redox-homeosztázist befolyásoló fémionok koncentrációviszonyai IBD-ben

Az CU betegek 37 %-a és a CD betegek 26 %-a anaemiás (Christodoulou 2000). Az anaemia gyulladásos bélbetegségekben több okra vezethető vissza. Elsődlegesen a vashiány okozza, amely a gyakori vérzéseknek, a csökkent bevitelnek és a felszívódási zavaroknak a következménye. Különösen a Crohn-betegség aktív szakaszában, illetve a terminális ileum resekciójakor jelentkezik B12-vitaminhiány. Folsavhiány szulfasalazin vagy metotrexát kezelések hatására alakulhat ki.

A nyomelemek hiánya kedvezőtlenül hat az immunrendszer fejlődésére és működésére, valamint a redox-homeosztázisra (Blázovics 2003, 2003a,b, Lakatos 2004). A réz koncentrációja a vérben pozitívan befolyásolja a C(3C) komplement aktiválódását a komplementrendszerben, és növeli a cöruloplazmin plazmaszintjét. A Zn több mint 300 enzim kofaktora, így gyakorlatilag a szervezet számára legfontosabb nyomelemek egyike, amely befolyásolja a nukleinsavsintézist, a fehérjék, zsírok és szénhidrátok metabolizmusát. Zn-ionok szükségesek a hem- és a hemoglobinszintézishez, szerepet játszanak a vörösvértestmembrán integritásának megtartásában. A Zn- és a Cu-ionok az oxidatív stresszel szemben védelmet biztosító szuperoxid-dizmutáz alkotói. A Zn hasonlóan a Cu-hez, befolyásolja az immunrendszer működését. A Zn korrelál az antinukleáris antitest (ANA) és a C(C3) komplement koncentrációival. IBD-ben a Zn és a Cu koncentráció-viszonyai befolyásolják a haematologiai paramétereket relapszusban. Amíg a vörösvértest Zn-státuszában nem találtak különbséget, addig a plazmában már jelentkezett kismértékű eltérés colitis ulcerosában (Dalekos 1998, Lakatos 2004, Van der Wal 1993). Ismert, hogy a Zn verseng a Ca-mal. Az is köztudott, hogy az IBD-ben szenvedő betegekben gyakori az osteopenia és osteoporosis (Ghos 2000, Gokhale 1999).

A komplexben kötött Fe, Zn, Cu és más elemek a DCT1 (divalent cation transporter) karrierfehérjével protonkapcsolt aktív kotranszporttal abszorbeálódnak, a sók abszorpciója paracelluláris úton, passzív transzporttal történik. A kétértékű átmenetifémionok gátolják a Zn felszívódását (Lakatos 2004). A homeosztázis miatt a vitaminok pótlása mellett a Fe, Mg, K, Na, Ca és a nyomelemek adása feltétlenül szükséges (Chandra 1999).

2.6.3. IBD és a colorectalis rák

A colorectalis rák kialakulása IBD-ben többlépcsős folyamat, amelyben több mutációt is feltételeznek. Kezdetben a mucosa displasiája figyelhető meg, majd aneuploidia talaján indul el a tumoros folyamat, melyet mikroszatellita-instabilitás követ, és ez gyakran kapcsolatos a DNS mismatch repair gén hMLH1 hipermetilálásával. Az IBD-asszociált daganatok esetében a szignáltranszdukció diszfunkciójával találkozhatunk. A p53 gén mutációja (17p kromoszóma allélvesztése vagy duplikációja) korai genetikai változás IBD-ben (Rabinovitch 1999).

Annak ellenére, hogy a p53 mutációja korán kimutatható, az adenomatosus polipus csak későn jelentkezik, úgynevezett „flat” tumorok kialakulása figyelhető meg. A COX2 enzimaktivitás fokozódása és a lipoxigenáz út erősödése társul a tumorogén tényezőkhez. Az arachidonsavkaskád beindulása teret nyit a szabadgyökös reakciók felerősödésének és a lipidperoxidációnak. A gyulladásos folyamatokban a mononukleáris sejtek infiltrációja miatt megnövekszik a proinflammatorikus citokinek mennyisége. A citokintermelésért, mint már említettem, az NF- κ B nukleáris faktor tehető felelőssé (Jobin 2000, Pavlick 2002).

Glikozilációs abnormalitások is megfigyelhetők a gyulladásos bélbetegségekkel asszociált colontumorban. E változások közé tartoznak az intracelluláris O-glikozidok rövidülése, a fokozódó szializáció, pl. a di- és tri-szialil Lewis-antigének megjelenése, a mucin redukált szulfatálása és az onkofetális antigének, mint például a Thomsen-Friedenrich (TF) (galaktóz - β - 1,3 - acetilgalaktózamin - α) vagy a szialil - Tn (szialil - 2,6 N-acetilgalaktózamin - α). A TF-antigént hordozó egyénekben a táplálékból származó vagy bakteriális eredetű lektinek (pl. amerikai mogyoró lektin) intraluminális megjelenése szignifikánsan növeli a rectumban a mitotikus indexet. Ily módon az intraluminálisan jelenlévő lektin hozzájárul a mucosa proliferációjához. A lektin felvétel galaktózban gazdag növényi rost fogyasztásával kompetitíven gátolható (Rhodes 2002, Rhodes 2000).

A szabadgyökös mechanizmusok a transzkripciós faktorok DNS-hez történő kötődését bizonyítottan befolyásolják. Ezekben a reakciókban az -SH, -S-S- kötéseknek különösen nagy jelentősége van, ha maga a DNS-molekula szenved szabadgyökös károsodást. Az aktiváció során - melyet például a TNF- α is elindíthat - intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedés és szabadgyök-képződés figyelhető meg. A c-jun és fos gének termékéből felépülő AP-1 faktor oxidatív stressz hatására fokozottan kötődik a DNS-molekulákhoz. A relatíve kis mennyiségben keletkező szabad gyök és a különböző reakcióutakon - például a SOD aktivitásának eredményeképpen - képződő H_2O_2 szekunder messenger szerepet tölt be a szignáltranszdukció folyamatában. Az oxidatív stresszre adott válasz során az NF- κ B és az AP-1 transzkripciós faktorok hatására megindul az antioxidáns enzimek szintézise, illetve a szabad gyököket termelő folyamatok is gátlódnak (Hagymási 2002, Kopper 2002, Pavlick 2002, Rhodes 2002).

A vas metabolizmusában például az IRP-1, illetve IRP-2 vas regulátor-fehérjék szerepe jelentős. E fehérjék a mRNS speciális vasérzékeny elemeihez „IRE” kötődnek. Az IRP-1 a transferrinreceptor expresszióját növeli, míg a ferritin transzlációja gátolt. Szabad gyökök hatására az IRE-kötő doménon diszulfidhidak képződnek, így az IRP-1-IRE kapcsolat megakadályozásával a ferritin expressziója nő és a transferrin csökken. Az eritropoetin az IRP-1-IRE kapcsolat aktiválásával a szervezet vasfelvételét indukálja. A szabad gyökök a HIF1 α transzkripciós faktor repressziója révén az eritropoetin expresszióját csökkentik (Lakatos 2004, Morel 1999).

Az apoptózis bonyolult biokémiai folyamatokon keresztül biztosítja, hogy a sejtek szaporodása megálljon a szövethatároknál, illetve a károsodott DNS-molekulák ne öröklődhessenek, és az előregedett molekulák az immunrendszer aktiválása nélkül eliminálódjanak helyet adva az új életképes sejteknek. Maga az apoptózis folyamata, akár külső halálligand hatására, akár a mitokondriumok „kilyukadásának” eredményeképpen vagy a „ceramid úton” megy végbe, rendkívül összehangolt lépésekből áll, amelyben a szabad gyököknek jelentős szerep jut. Apoptózis hiányában a sejtproliferáció, illetve a rák incidenciája nő (Kopper 2002, Pavlick 2002, Powis 1997, Rhodes 2002).

2.7. Nem nutritív táplálkozási faktorok

Már több ezer évvel ezelőtt az ókori Egyiptomban (Ebers Papirusz), ill. a Távol-Keleten Kínában (Confucius K.e. 551-470) is ismerték és fogyasztották a különböző növényekből készült forrázatokat, vizes extraktumokat. Európában, a középkorban Hildegard von Bingen disibodenbergi apátnő (1098-1197) volt híres gyógynövényismeretéről, aki a „Sci vias”, „Causae et curae” és a „Physica” könyvekben foglalkozott a betegségekkel és azok gyógy módjával. A gyógyhatású készítmények erősítették az emberek immunrendszerét, elősegítették emésztésüket, ill. hozzájárultak szervezetük méregtelenítéséhez (Blázovics 1999, Blázovics 2002a, Győry 2000, 2003, Rapavi 2000, 2000a, Janick 2002). Az előbb említett írásos emlékekből és a Bibliából az is ismertté vált, hogy bizonyos zöldségféléknek és gyümölcsöknek már igen korán megtapasztalták kedvező gyógyító értékét is (Blázovics 2002a, Győry 2003).

Német kutatók 1931-től olyan kísérleteket végeztek, melyek a radioaktivitás káros hatásainak kivédésére szolgáló élelmiszerek kiválasztására irányultak. A kutatások az 1950-es években felerősödtek, amikor az USA kormánya kiterjedt nukleáris kísérletekbe fogott. A németek a káposztaféléket találták alkalmasnak arra, hogy egy esetleges nukleáris katasztrófát túl lehessen élni. Az azóta eltelt időszakban számtalan kutatási eredmény erősítette meg, hogy a káposztafélék, a kel, karalábé, brokkoli és a fekete retek hatóanyagai antioxidáns tulajdonságuk miatt kiválóak a vastagbél tumoros megbetegedéseinek kivédésében (Lugasi 2001, Blázovics 2002a). A kelkáposzta A-provitamintartalma jelentős, ezért, mint potenciális vitaminforrást vehetjük számításba. Úgy tűnik, hogy az összes rákmegelőző élelmiszer közül a kelbimbó a legkiválóbb. E hatásban a glükoszínolátoknak is fontos szerepet tulajdonítanak, melyek a káposztafélék fő hatóanyagai közé tartoznak (Fenwick 1983, Lazzeri 1993, Rosa 1996, Lugasi 1998).

A gyógy- és aromanövények ma is fontos szerepet játszanak a népesség egészségmegőrzésében a fejlett nyugati és fejlődő országokban egyaránt. Így ezeknek a növényi anyagoknak a fontossága a világon igen jelentős, amely a nagyméretű nemzeti és nemzetközi kereskedelemben is

megjelenik. A 90-es évek során az importforgalomban a gyógy- és aromanövények mennyisége átlagban elérte az évi 400 ezer tonnát 1243 millió USA dollár értékben. A vad összetételű gyógy- és aromanövény-keverékek voltak a legfontosabbak ezen a piacon (Harrison 2002, Lange 2002). A szabályozatlan élő kultúra lepusztulása miatt azonban világszerte felbecsülhetetlen károk keletkeznek a vad növényi populációkban. Ez a vad populációk genetikai anyagának elvesztését, és a növényi változatosság csökkenését eredményezheti.

A gyógynövény alapú készítmények általában étrendkiegészítőként, vagy vénnyel nélkül kapható gyógyszerként kerülnek forgalomba. Az USA-ban például étrendkiegészítő kategóriába sorolják a növényi eredetű életminőséget javító termékeket (Dietary Supplement Health and Education, 1994). Ez a kategória az élelmiszerek és OTC-készítmények között helyezkedik el. A készítmények minőségét nem szabályozzák hivatalos előírások, nem kell igazolni azok hatásosságát sem, bár tudományos igényű állításokat mellékelhetnek. Nyugat-Európában a drogok felhasználásával készült termékekre az OTC gyógyszerekre vonatkozó rendeletek vannak érvényben (Yuan 1997). Magyarországon az emberi felhasználásra kerülő gyógyszerekről szóló 1998. évi XXV. törvény végrehajtási utasításában kiadott 12/2001. (IV. 12.) Eü.M. rendelet alapján a „gyógyszernek nem minősülő gyógyhatású anyag vagy termék” kategória 1999. január 1-jén megszűnt. A rendelet értelmében megkülönböztetnek természetes gyógyszer, növényi drog és növényi eredetű gyógyszerformát. A gyógyszerre minősítés szigorú követelményei közé tartoznak például a minőségbiztosítás, a meghatározott gyártási procedúra, a hatásosság klinikai igazolása, a készítmény relatív ártalmatlansága, gyakorlatilag, a gyógyszerre minősítés esetében szükséges követelményeknek való megfelelés (Good Clinical Practice). Azok a termékek, amelyek nem felelnek meg a „gyógyszer” minősítésnek, az élelmiszerkategóriába kerülnek, és így azok kontrollálatlan mennyiségben válhatnak fogyaszthatóvá. Előfordulhat viszont e készítményekkel szemben fellépő allergia, vagy az együtt szedett gyógyszerekkel jelentkező nemkívánt kölcsönhatás. Tehát az élelmiszernek minősített (gyógyhatású) termékek hatóanyagainak is meg kell ismerni a hatásmechanizmusát és hatásspektrumát a túlzott fogyasztás vagy a téves alkalmazás elkerülése végett.

A növényi eredetű hatóanyagok kutatásával foglalkozó szakemberek attól tartanak, hogy az utóbbi néhány évben a médiából áradó marketing szellemiség következtében a köztudatba az a téves felfogás fészkelte be magát, hogy az antioxidánsok és vitaminok, valamint a nyomelemek bőséges fogyasztása az egészségmegőrzés kulcsa. Ez a feltételezés helytelen, mert mint azt az előző fejezetekben összefoglaltam, a szervezet redox-homeosztázisától bármely irányban történő jelentős eltérés súlyos következményeket vonhat maga után. Az antioxidánsok megváltoztathatják a szignáltranszdukciós utakat, a sejtek szaporodását, vagy apoptózisát, illetve

apoptózis hiányában tumoros folyamatokat indukálhatnak. Antioxidánsok túladagolása miatt prooxidáns hatás is érvényesülhet (McCay 1985, Terao 1986, Takahashi 1989, Hagymási 2004). Megfelelő ismeretek hiányában, a napi étkezések alkalmával, az egyébként nélkülözhetetlen nem nutritív tápanyagkomponensek többszöröse juthat be a szervezetbe, ill. az aktív komponensek arányaiban történő durva eltolódások miatt súlyos, életveszélyes károsodások léphetnek fel, különösen az életminőséget rontó, hosszantartó betegségekben, mint például a gyulladásos bélbetegségek, alkoholos májbetegségek, diabetes stb. (Sonnenbichler 1984, 1986, 1988, Roginsky 1994, Palozza 1995, Blázovics 2004, Héthelyi 2001, Kocsis 2004).

Tehát a gyógynövények értékelése és újraértékelése napjaink feladata, különösen a betegségek megelőzése és a gyógyítás eredményessége érdekében. Ezért kutatásainknak új lendületet adott a növényi hatóanyagok hatásmechanizmusának és hatásspektrumának megismeréséhez szükséges korszerű vizsgálati repertoár kialakítása iránti igény (Fejes 1998, 2000, 2000a,b, Dworschák 1999, Hagymási 1999, 2000, 2000a,b, 2001a, Lugasi 1998, 1999a,b, 2001, 2002, Szentmihályi 2000, Czinner 1999, 2000, 2001, Sípos 2002, Kocsis 2002, 2004, Blázovics 2000, 2002)

2.7.1. Antioxidáns vitaminok

Az „antioxidáns” fogalomhoz hosszú időn át csak a szabad gyökökkel szembeni védelem fűződött. Jelentőségük nem kétséges az oxidatív stresszel összefüggő állapotok terápiájában. A Janus-arcú antioxidánsok azonban a fehérjefoszforiláció és a transzkripciós faktorok gátlásával megakadályozhatják a sejtproliferációt. A transzkripciós faktorok aktivációjának gátlásával károsíthatják az oxidatív stresszel szembeni adaptációs mechanizmusokat. Az átmenetifémionok redukálásával felerősíthetik az oxidatív stresszt. Gátolhatják a szabad gyökök által kezdeményezett apoptózist, és fokozhatják a nekrotikus folyamatokat is (Blázovics 1996b, Halliwell 2000, Fehér 2004, Simopoulos 2004).

Ebben a fejezetben, a dolgozat terjedelmére való tekintettel, csak néhány példán keresztül szeretném megvilágítani az antioxidáns vitaminok élettani fontosságát.

Az A-vitamin a β -karotinból képződik a bélhámsejtek enzimjeinek hatására. A növényvilágban elterjedt poliizoprenoid vegyületcsalád több mint 500 képviselője közül azonban csupán kb. 30-nak van A-vitaminszerű hatása. Ilyen vegyületek még a lutein, likopén, fukoxantin, kanthaxantin, kriptoxantin, zeaxantin. Az A-vitamin fiziológiásan a látás, hámképződés, növekedés, szaporodás, immunfolyamatok, csontanyagcsere és a nyálkahártyák fiziológiás működéséért felelős. E sokoldalú hatás oka az, hogy az A-vitamin és az aktív retinoid metabolitok mint ligand-dependens transzkripciós faktorok vesznek részt a génszabályozásban (Petkovich 1987, 1992). A retinoidok hatásmechanizmusának kutatásában döntő jelentőségű volt a mag retinsav-receptor, majd a retinolkötő fehérje felfedezése, valamint az intracelluláris

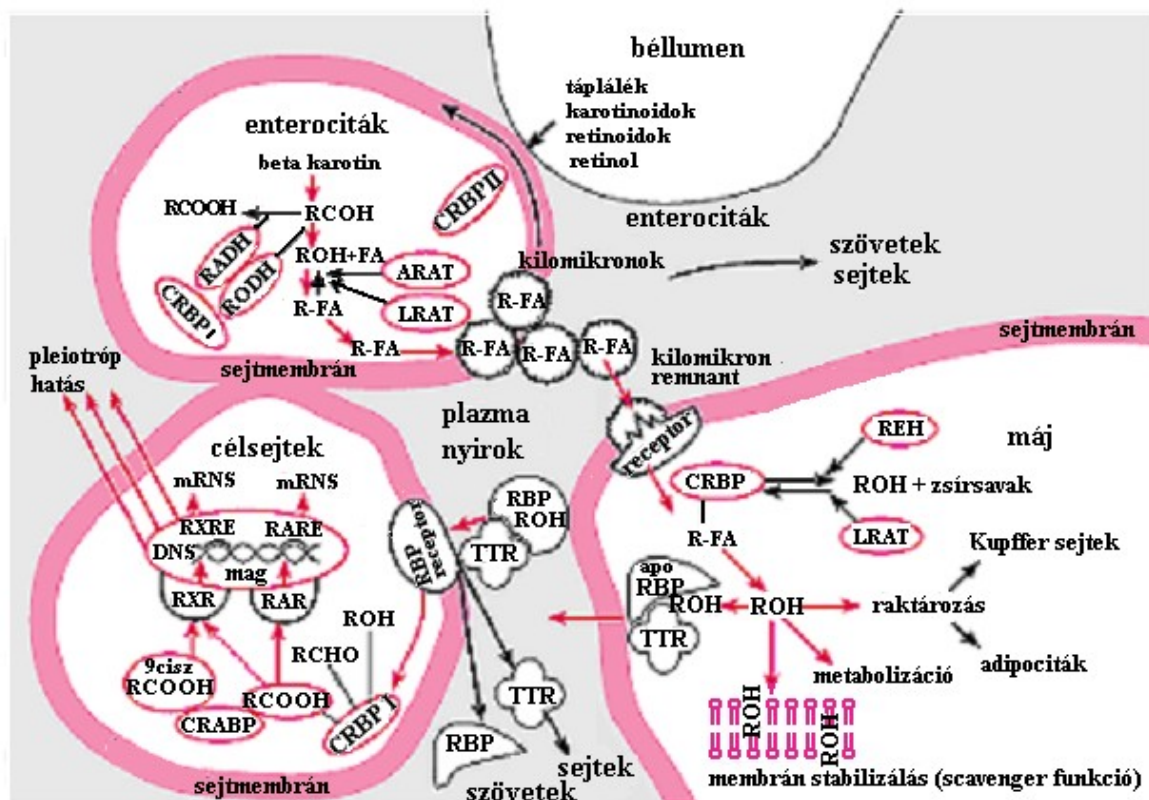
transzportmechanizmus és a celluláris felvétel szabályozásának megismerése, továbbá a magreceptorok és válaszelemek génszakaszainak klónozása (Barua 1993, Geiger 1994, Leid 1992, Mano 1994, Sass 1994, Sato 1993, Wei 1995).

Az A-vitamin is fontos a szív- és érrendszeri betegségek kezelésre, valamint a rák megelőzésére, bőrbetegségek gyógyítására, de túlzott fogyasztása a nyálkahártyák és a bőr kiszáradását, elszarusodását okozza. Idegrendszeri és endokrin tünetek jelentkeznek. Teratogén, mutagén és karcinogén hatása mellett a vírusok expresszióját is kiválthatja. A karotinoidok elsőrendű antioxidánsok. Védnek az oxigén szabad gyökökkel szemben, közömbösítik a peroxid gyököket. A β -karotin antioxidáns viselkedése erősen függ az oxigén tenziójától. 15-20 torr oxigénnyomáson antioxidáns, 760 torr nyomáson pedig prooxidáns (Vásárhelyi 1993, Blázovics 1996b). A nagy koncentrációban A-vitamint, illetve β -karotint tartalmazó növények, például a sárgarépa, sütőtök és a citrusfélék túlzott fogyasztása Crohn-betegségben és colitis ulcerosában nem ajánlott, mert a betegség fellángolását idézheti elő (Tragnone 1995). Az antioxidáns tulajdonságú likopénnek, amely például a dinnye és paradicsom termékek piros színét adja, epidemiológiai vizsgálatok tumorgátló hatását is igazolták (Perkins-Veazie 2002). A β -karotin szintén véd a rákos folyamatoktól, azonban túlfogyasztása egészségtelen. Az A-vitamin megadózisa ugyanúgy betegséget okoz, mint hiánya (Vásárhelyi 1993, Blázovics 1996b).

A 13. ábra az A-vitamin útját vázolja fel a szervezetben.

13. ábra

Retinoidok a ligand-aktivált transzkripció folyamatokban



(Blázovics 1996b, 2001)

(RCHO=retinal, ROH=retinol, RCOOH=retinsav, R-FA=retinil - észter, CRBP(I,II)= cellular retinol-binding protein (I,II), CRABP(I,II)=cellular retinoic acid-binding protein (I,II), RADH=retinal-dehidrogenáz, RODH=retinol-dehidrogenáz, ARAT=acil-CoA-retinol-aciltranszferáz, LRAT=lecitin-retinol-aciltranszferáz, REH=retinilészter-hidroláz, TTR=transztiretin, ApoRBP=apo-retinol-binding protein, RBP-receptor=retinol-binding protein receptor, DNS=deoxiribonukleinsav, RXR=(α , β , γ) retinoid receptorcsalád, RAR=(α , β , γ) retinoid receptorcsalád, RXRE=retinoid receptorok által szabályozott gén funkcionális egység, RARE=retinoid receptorok által szabályozott gén funkcionális egység, 9-cisz-RCOOH= 9-cisz retinsav)

Az A-vitamin legfőbb raktározó szerve a máj. Az A-vitamin létfontosságú a látás, a növekedés, a szaporodás, a csontanyagcsere és az immunrendszer folyamataiban. Fontos szerepet tölt be az epitheliális struktúrák proliferáciájában és differenciálódásában.

A-vitamin hiányában módosul az epithelialis funkció, fokozódik az epidermális keratinizálódás és a nyálkahártyák pikkelyes metapláziája. Az A-avitaminózis látászavarhoz (farkasvakság) xerophthalmiahoz, cholelithiasishoz és fertőzések elhatalmasodásához vezet. Az A-vitaminkezelés retinol vagy retinil-észter formájában képes megszüntetni az említett defektusokat. Kedvező terápiás hatásait bőrbetegségek kezelésére már több mint 50 éve ismerik. Sikeresen alkalmazták Darier-betegségben, ichthyosisban, acnéban és psoriasisban. A kezelése során azonban sok esetben a vitamin túladagolása következtében az A-hipervitaminózis súlyos tünetei lépnek fel. Az A-hipervitaminózis a nyálkahártyák kiszáradását, az egészséges bőrfelület intenzív hámlását

okozza. A következményes fertőzések súlyosbítják a betegek állapotát. A súlyos endokrin és idegrendszeri tünetek mellett a karcinogén és teratogén hatásról sem lehet megfeledezni (Adams 1993, Geiger 1994).

Az A-vitamin túladagolása alkoholistákban a CYP2E1 fokozottabb indukciója miatt a vitamin toxicitását fokozza, cholestasis és krónikus májbetegség tünetei jelentkeznek (Blázovics 2004).

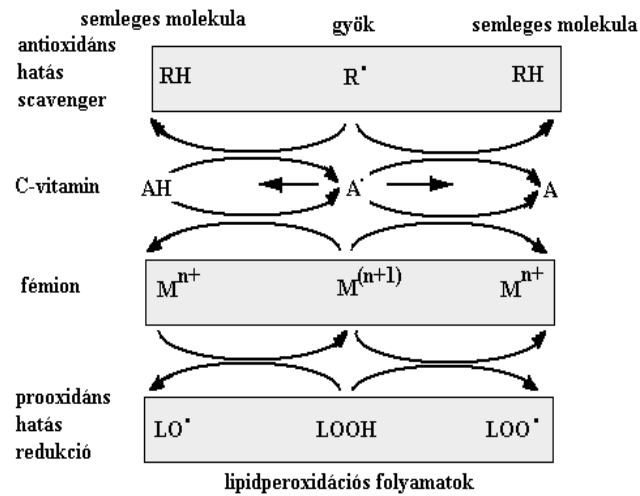
A Science 1996-os 271-es számában arról számolt be, hogy egy reprezentatív vizsgálatban, amelybe 18314 fokozottan veszélyeztetett személyt vontak be, a rákprevenció tekintetében negatív eredményt kaptak, mert a β -karotinnal kezelt betegek tüdőrák megbetegedése 28 %-kal nőtt, és a halálozások 17 %-kal emelkedtek a placebocsoporthoz viszonyítva (Peterson 1996). Ez a negatív eredmény egy korábban végzett kutatás (CARET study) eredményeihez mutatott hasonlatosságot (Omenn 1994).

A β -karotin 250-500 mg/kg dózisban a CYP1A1/2, CYP3A1/2, CYP2E1, CYP2B1/2, CYP2C11 enzimeket indukálja a májban, tüdőben, bélben és a vesében, melyek a szabad gyökök túlprodukióját eredményezik (Paoloini 2001, Hagymási 2004).

Szent-Györgyi Albert felfedezése óta a C-vitamin töretlen karriert futott be, bár a vitamin anyagcserében játszott szerepe még ma sem teljesen tisztázott. Szent-Györgyi szerint a C-vitamin szükséges a fehérjék aktív elektronállapotának fenntartásához. A C-vitamin lánctörő antioxidáns. Oxidációs terméke a dehidroaskorbát. Feltételezik, hogy az askorbinsav megakadályozza a fehérjék glikációját, ezáltal csökkenti a következményes komplikációk kialakulását diabetes mellitusban. Az askorbát oxidált formája önmaga képes glikálni a fehérjéket, de a reakció mechanizmusáról és az askorbilált fehérjék szerepéről ma még keveset tudunk. A C-vitamin nagyobb dózisa (500 mg/ttkg) patkányokban már 4 napos kezelés alatt indukálta a CYP2E1 izoenzimét, mely szuperoxidánion képződést eredményezett. (Paolini 1999). A C-vitamin genotoxicitását a xantinoxidáz működését fokozó hatás eredményeként képződő szuperoxidánionnak tulajdonítják (Herbert 1993). A C-vitamin alkoholistákban fokozza a mikroszomális enzimindukciót, mely szabad gyökök képződéséhez vezet (Hagymási 2004).

A C-vitamin regenerációját illetően egyesek úgy vélik, hogy a dehidroaskorbinsav enzim mediált folyamatban nyeri vissza aktív állapotát. A tradicionális nézet szerint a glutation direkt kémiai redukcióban biztosítja fiziológiásan az askorbinsav regenerálódását (Winkler 1994, Rose 1995, May 1996). A 14. ábra az askorbinsav koncentrációfüggő antioxidáns és prooxidáns tulajdonságát szemlélteti.

Az aszkorbinsav antioxidáns és prooxidáns tulajdonsága



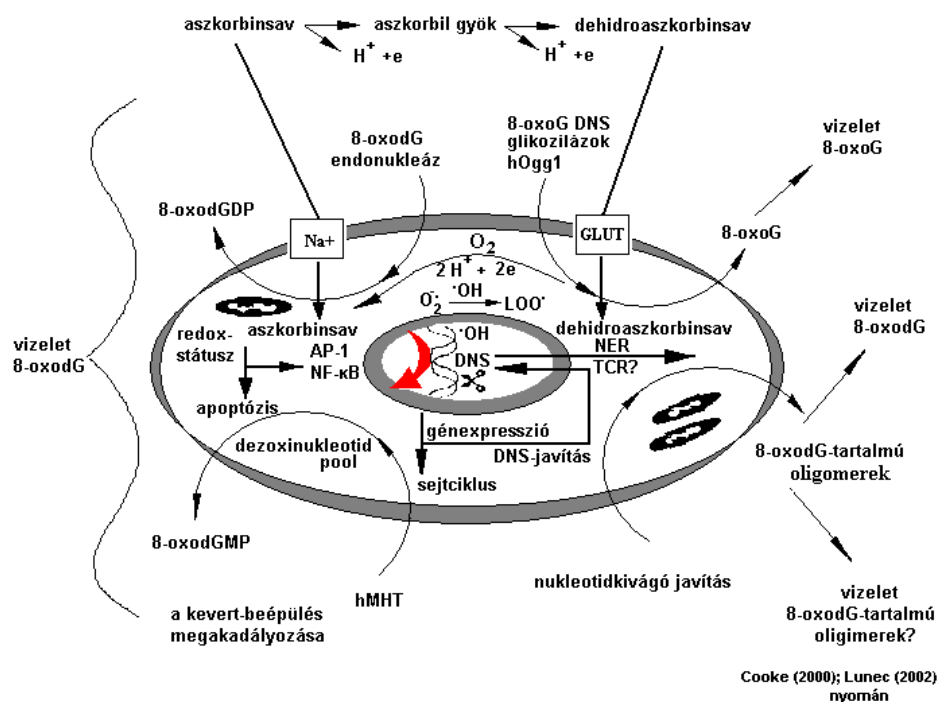
Az aszkorbinsav pro - és antioxidáns tulajdonsága függ koncentrációjától és a fémionok jelenlététől. A C-vitamin az E-vitamin koantioxidánsa (Veris 1995, Tsuchiya 1992).

Az utóbbi évek molekuláris biológiai kutatásainak eredményei alapján a 15. ábra az aszkorbinsav feltételezett DNS-javító és károsító hatását mutatja be Cooke (2000, 2002) és Lunec (2002) hipotézise nyomán. A C-vitamin úgynevezett „redox-úton”

szabályozza a 8-oxodG javítását. Az aszkorbinsav direkt DNS-oxidáló hatása függ in vivo koncentrációjától. A DNS-károsodást követően új javító enzimek de novo szintézise indul el, amely a Fos- és Jun-fehérjék komplexének kialakulásával hozható kapcsolatba.

15. ábra

Aszkorbinsav és a DNS redox-javítás



8-oxodG = 8-oxo-2'-deoxiguanozin; hOgg1 = humán 8-oxoguanin-glikoziláz; NER = nukleotid kivágó javítás; hMHT = MutT-enzim humán-homológ; TCR = transzkriptító, GLUT = glükóztranszporter; Na^+ -transzport; 8-oxoG = 8-oxo-guanozin

Az aszkorbinsav szerepe az AP-1 aktiválásban prooxidáns hatásának köszönhető. Az AP-1 a DNS oxidatív károsodását követően így részt vehet egy generalizált adaptív vagy stressz-

válaszban. Az aszkorbinsav továbbá, mint redukáló ágens erősíti a Ref-1 által szabályozott AP-1 DNS-hez történő kötődését.

Feltételezik, hogy a 8-oxodG 25 %-át a „long patch” javítómechanizmus távolítja el. A NER szerepe ebben nem szignifikáns, bár a különböző körülmények hatására aktiválódó NER alternatív út lehet a javításban. A C-vitamin és az E-vitamin génszintű hatásaiban sok hasonló vonás fedezhető fel.

Az E-vitamin nagy mennyiségben található a gabonafélékben, gyümölcsökben (alma, banán, sárgadinnye, eper), zöldségfélékben (spárga, spenót, bab, borsó, brokkoli, paradicsom). A természetben 4 tokoferol és 4 tokotrienol molekula rendelkezik E-vitaminhatással. Ezek közül a leghatásosabb a d- α -tokoferol. Az E-vitamin mai tudásunk szerint univerzális antioxidáns, meggátolja a lipidperoxidációt (Sies 1991, Kuhlenkamp 1993) Az E-vitamin szinglett oxigénmolekulákkal, hidroxil-, alkoxil- és peroxilgyökökkel képes reakcióba lépni, miközben belőle kevésbé reaktív tokoferoxil rezonanciastabil gyök keletkezik (Matsuo 1989, Liebler 1990). A tokoferoxil-gyököt az aszkorbinsav és a GSH regenerálja a vizes fázis felől. Az aszkorbinsav regenerálását pedig az úgynevezett flavonoid típusú vegyületek végzik (Burton 1986, van Acker 1993, Smith 1993, Sharma 1993, Blázovics 2001).

Az E-vitamin a szív- és érrendszeri megbetegedések megelőzésében játszik elsődleges szerepet. Az E-vitamin azonban nagy dózisokban (200-600 U/nap) újszülöttekben szövettanilag igazolt hepatotoxicitást eredményezett (Witting 1980).

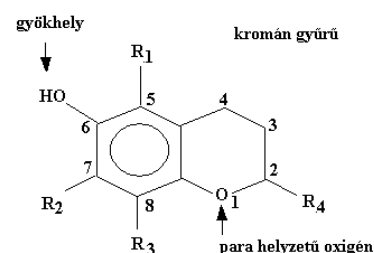
Epidemiológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy az antioxidánsok kombinált alkalmazása tumoros betegeknél és cerebrovascularis betegségekből kedvezőbb, mint monoterápiájuk (Potter 1997). Ennek az az egyszerű magyarázata, hogy az inaktív formába kerülő, vagy prooxidánssá váló antioxidánsok redoxipotenciájuknak megfelelően egymást regenerálni képesek, illetve az egyes antioxidánsok különböző gyököket közömbösítenek.

A 16. ábra az E-vitamin kromángyűrűjének gyökhelyét mutatja.

Az E-vitamin hatásmechanizmusában döntő a kromángyűrű protondonor-aktivitása. Az E-vitamin a posttranszlációs szintnél gátolja a proteinkináz C-t, az 5-lipoxigenázt és a foszfolipáz A2-t, aktiválja a proteinfoszfátáz 2A-t és a diacilglicerolkinázt. Újabb kutatások szerint az E-vitamin más antioxidánshoz nem hasonlítható módon vesz részt számos gén szabályozásában (Bocoboinik 1991, Zingg 2004). Ezeket a géneket öt nagy

csoportba lehet sorolni. Az egyes csoportba az α -tokoferol-transzferprotein (α -TTP) és a citokróm P450 (CYP3A) gének tartoznak. A második csoportba a CD36, SR-B1 és az SR-AI/II gének sorolhatók, melyek kapcsolatban állnak a lipidfelvétellel és az arteriosclerosissal. A

16. ábra



R₁₋₄ : szubsztituensek

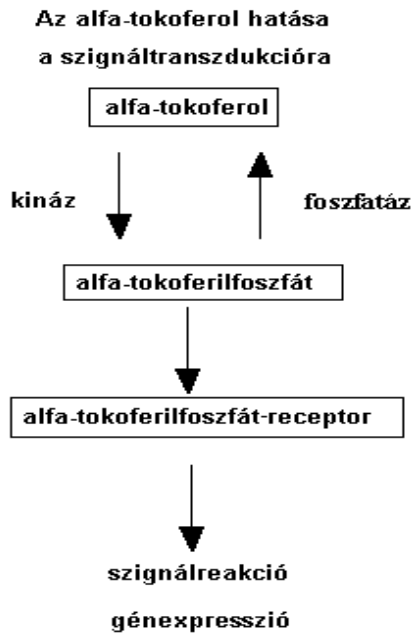
harmadik csoport tagjai a tropomyozin, kollagén (C-1), MMP-1, MMP-19 és a kötőszövet növekedési faktor (CTGF) gének, amelyek az extracelluláris fehérjék expressziójának szabályozásáért felelősek. A negyedik csoport az E-szelektin, ICAM-1, integrinek, glikoprotein IIb, II-2, IL-4 és IL- β szintéziséért felelős géneket tartalmazza. Ezek a gének állnak kapcsolatban a gyulladásos folyamatokkal, a sejtadhézióval és a trombocita-aggregációval. Az ötödik csoport génjei kódolják azokat a fehérjéket, amelyek a sejtszignál- funkciókért és a sejt életfolyamatainak szabályozásáért felelősek. Ide tartoznak a PPAR- γ , a ciklin-D1, ciklin E, Bcl2-L1, p27 és CD95 (Apo-1/Fas ligand) génjei. A p27, Bcl2, α -TTP, CYP3A, tropomyozin, II-2, PPAR- γ és a CTGF upregulációjáért feltehetően egy vagy több tokoferolt lehet felelőssé tenni. Számos mechanizmus támasztja alá a tokoferol-függő génszabályozást. Néhány esetben a PKC-nek is szerepe van, mert az α -tokoferol gátolja az aktivitását. Részt vesz több transzkripciós faktor szabályozásában, mint például a NF- κ B és AP-1 esetében. Más esetekben PXR/RXR direkt hatással lehet számolni. Az antioxidáns válaszelem (ARE) és a transzformáló növekedési faktor- β -válaszelem TGF- β RE megjelenése dokumentálható. A tokoferolhatás mediátorainak heterogenitása egy receptor vagy koreceptor létét sugallják, amely képes kapcsolatot teremteni a tokoferol és a transzkripciós faktorok között a szenzitív gének promoter szekvenciáinak specifikus régiója irányában (Azzi 2004).

Még számos kérdés tisztázatlan az α -tokoferol közvetlen és közvetett hatásainak kapcsán. Csak 2003-ban írták le az α -tokoferol transzferprotein szerkezetét, bár a kutatások e területen régóta intenzíven folytak (Zingg, 2004). A közelmúlt kutatási eredménye számos újszerű tokoferolkötő fehérje klónozása is (Kempná 2003). A receptorhoz történő kötődés azonban tisztázásra vár nemcsak az α -tokoferol, hanem a tokoferilszukcinát és tokotrienolfoszfátok esetében is.

A PKC aktivitás gátlása az E-vitamin hatására kimutatható volt monocitákban, makrofágokban, neutrofilekben, fibroblasztokban és mezangiális sejtekben. A PKC-gátlás különböző módon jut érvényre a különböző sejtekben: trombocitaaggregáció-gátlásban, NO és O_2^- képződés gátlásában, a simaizom sejtprolifерáció gyengülésében. Az adhéziós molekulák expressziója és a gyulladásos citokinek képződése szintén kapcsolódik az E-vitamin hatásához. Az oxidált LDL scavengerreceptor SR-A és CD36 transzkripciós szintnél down-regulált, tehát az E-vitamin a CD36 scavengerreceptor működésének alulszabályozásán keresztül is hat (Azzi 2004a).

A γ -tokoferol a ciklinek down-regulálásával képes gátolni a humán prostata, colorectalis adenocarcinoma és osteosarcoma rákos sejtek sejtciklusának progresszióját és a sejtprolifерációt (Gysin 2002).

Emlős sejtekben kimutatható az α -tokoferilfoszfát, melynek



Azzi (2004) nyomán

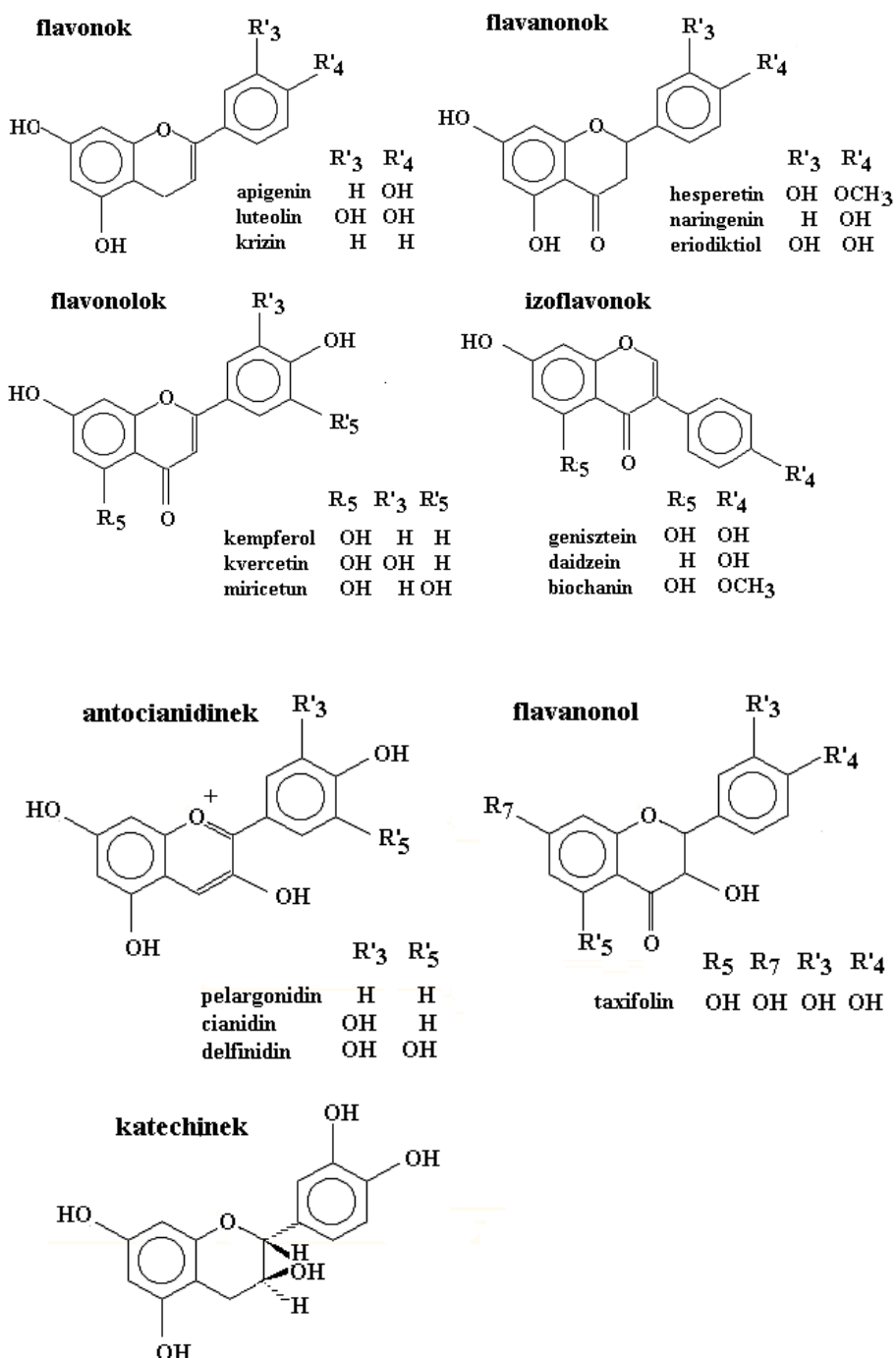
prekursora az α -tokoferol. Ez a vegyület a májban és a zsírszövetben halmozódik. Az α -tokoferilfoszfát kb.150 pg/g koncentrációban található a májban. Elképzelés szerint a tirozin-kináz katalizálhatja az átalakítást a ma ismert 7 alcsoportba tartozó 587 proteinkináz közül. A foszfataz esetében a tirozinfoszfát-foszfataz jöhet szóba. Nem ismert még a foszfataz inhibitora sem. A 17. ábra Azzi (2004) nyomán szemlélteti az α -tokoferilfoszfát receptorfüggő hatását a génexpresszióra.

2.7.2. Polifenolok, flavonoidok

A közvetlen szabadgyök-befogásban és a lipidperoxidáció megakadályozásban fontos szerepet kapnak a táplálékkal szervezetünkbe jutó polifenolok és ezen belül a flavonoidok (Fujita 1988, Shimoi 1999, Edwards 1979, Bors 1990, Hertog 1992, Breinholt 1999, Conquer 1998). A „polifenol” mindazon molekulák gyűjtőneve, melyek több fenolos hidroxilcsoportot tartalmaznak. Ilyen vegyületek a hidrolizálható cserzőanyagok (galluszsav származékok), a kondenzált cserzőanyagok (proantocianidinek), flavonoidok, kumarinok, lignánok, ligninek és más kismolekulák, mint például a katechinek vagy a pirogallol. A cserzőanyagok fehérjékhez, bázikus molekulákhoz kötődnek vagy nehézfémekkel reagálva csapadékot képeznek (Luckner 1972, Robak 1988, Salunkhe 1990, Ricardo Da Silva 1991, Manach 1997, Brouillard 1988, Herrman 1988, Hertog 1993, Fejes 2000). E vegyületek egyik jelentős csoportja a humánéletteni szempontból is fontos flavonoidok (Bors 1987, 1990, 1992, György 1990). A flavonoidokhoz sorolhatók a difenil-propán-vázis oxigéntartalmú heterociklusos és a velük szerkezeti izomér nyíltláncú vegyületek, melyek a magasabb rendű növényekben, gyakorlatilag azok minden részében előfordulhatnak. A flavonoidok és izoflavonoidok nagy szerkezeti változatosságot mutatnak, és ma már körülbelül 6000 képviselőjük molekulaszerkezetét ismerjük. A külön-bözség az oxidációfok és a szubsztitúció következménye. A flavonoidok a fenolos hidroxil-csoportok számában és helyzetében mutatnak nagy variabilitást. A flavonoidok antioxidáns hatása a molekula funkció csoportjainak elhelyezkedésétől függ, de ezek a szubsztitúciós helyek felelősek a gyakori toxicitásért is, ezért feltételezhető, hogy a reakciókban a redoxi-átmenetek is szerepet játszanak (Baba 1981, Carver 1983, Dunnick 1992, Breinholt 1999).

A 18. ábrán a flavonoidok ismertebb osztályait mutatom be.

18. ábra



A hidroxilcsoportokat helyettesíthetik O-metil, O-alkil, O-glikozil-csoportok. Glikozidjaikban a glikozilcsoportok száma, típusa és helye határozza meg a vegyület tulajdonságait. A flavonszármazékok között találhatók kumaro- és izokumaro flavonok, furanoflavonok, biflavonok, kumesztánszármazékok, rotenoidok (Miller 1957, Tarr 2002).

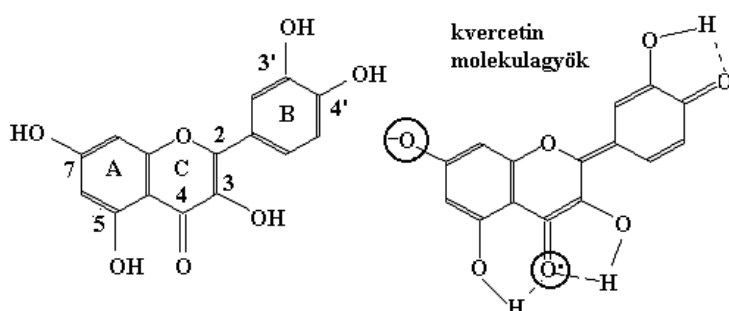
A polifenolok, ill. flavonoidok szerkezetüktől függően erős antioxidáns tulajdonságúak. Az antioxidáns tulajdonság feltételei az 5,3',4'-pozícióban lévő OH-csoportok és a 4-es pozícióban karbonilcsoport jelenléte, viszont a C₂-C₃ atomok közötti kettős kötés úgy tűnik nem játszik nélkülözhetetlen szerepet a flavonoidok hatáserősségében. Ezek a molekulák könnyen adnak le

egy hidrogénatomot a 7-es pozícióból. A fenolos OH-hoz orto helyzetben kapcsolódó alkil-szubsztituensek a B gyűrűn nagymértékben növelik a H-donor-aktivitást (Torel 1986, Tarr 2002, Timberlake 1980, Robak 1988, Bors 1990, Kandaswami 1994).

E molekulák védik a növényeket az UV-sugárzástól, oxidatív károsodásoktól, rovar- és gombakártevőktől. E csoport képviselői adják a virágok és gyümölcsök színét. A vizsgált növények csaknem 75 %-ában előfordul a kvercetin és a kempferol, míg 10 %-ukban a miricetin is kimutatható. A legelterjedtebb glikozid a rutin, amely a növények 50 %-ában van jelen. Az élelmiszerekben leggyakrabban előforduló vegyületek a kvercetin, rutin, robinin. A glikozidok az intestinális baktériumflóra segítségével hidrolizálnak és válnak biológiailag aktív aglikonokká (Hackett 1986, Hollman 1995, 1996, Fehér 1996). Az izoflavonoidok és azok glikozidjai a hüvelyesekben találhatók számottevő mennyiségben (Tarr 2002). Epidemiológiai felmérések szerint az öt leggyakrabban előforduló flavonoid napi bevitele a 25 mg-tól az 1g-ig terjed (Luckner 1972, Timberlake 1980, Brouillard 1988, Lugasi 2000). A 19. ábrán a flavonoid típusú molekulák antioxidáns tulajdonságáért felelős szerkezeti elemek láthatók.

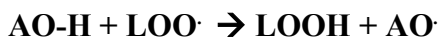
19. ábra

Az antioxidáns tulajdonság feltételei



A flavonoidok elektrondonor antioxidánsok. A láncmegszakító elektrondonor antioxidánsok a telítetlen lipidekkel (LH) versenyeznek a lipidperoxid-gyökökért $\text{LOO}^\cdot$, és így gátolják az $\text{L}^\cdot$ gyök képződését, ezáltal lassítják a propagációt (Frankel 1991).

A rájuk jellemző reakció a következőképpen írható le:



AO-H = antioxidáns vegyület

$\text{LOO}^\cdot$ = lipidperoxidgyök

$\text{AO}^\cdot$ = antioxidásból képződött szabad gyök

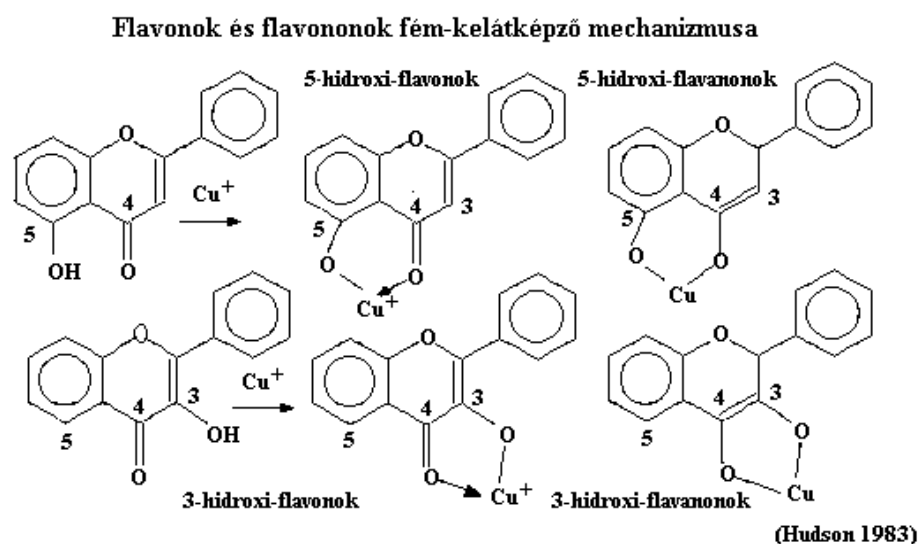
LOOH = lipidhidroperoxid

A lipidperoxidációt gátló antioxidánsok láncmegszakító, fémkomplexbéplő és $^1\text{O}_2$ közömbösítő hatásúak. Az antioxidánsok kémiai reakcióik során maguk is szabad gyökökké válnak, azonban reakciósebességük nagyságrendekkel eltér a radikális gyökökétől. Relatív stabil gyökök. A fenolszármazékok kiváló komplexképlő tulajdonsága hozzájárul az oxidatív stressz

csökkentéséhez. A kelátképző antioxidánsok esetében a fémionok hidroxid bontó és szabadgyök-generáló képessége nem jut érvényre (Frankel 1991).

A 20. ábrán a komplexképzés feltételeit mutatjuk be: a 3',4'-dihidroxi konfiguráció, a 4-es pozícióban karbonilcsoport jelenléte és a 3-as helyen szabad hidroxilcsoport (Hudson 1983)

20. ábra



Az első hazai élettani kutatások Rusznyák és Szent-Györgyi nevéhez fűződtek, akik e vegyületek vitamin-jellegét feltételezték (Rusznyák 1936). A későbbi kutatások azonban a „P-vitamin” (pemeabilitást csökkentő vitamin) vitamintulajdonságát nem igazolták. Kiderült, hogy a P-vitaminnak elnevezett anyag a heszperetin és eriodiktiol glikozidjainak keveréke. A flavonoidok élettani fontosságát igazolja, hogy több képviselőjük gyógyszerformában is rendelkezésre áll. A rutint például magyar szabadalmi eljárás szerint vonják ki ipari méretekben (Bognár 1957).

Mivel a fenoloidok vízben rosszul, vagy egyáltalán nem oldódnak, a bor alkoholtartalma kiváló oldószernek bizonyul. Az alkohol jól oldódik vízben, és könnyen átjut a membránok lipid-kettősrétegén, így az alkoholban oldott polifenol-származékok könnyebben jutnak át a sejtmembránokon. Az antioxidánsok hatásereősége eltérő a vizes oldatban és a lipid-fázisban.

Példa a vizes fázisban mérhető antioxidáns különbségekre:

epikatechin-gallát > epigallokatechin-gallát > galluszsav > epikatechin > katechin

Példa a lipid-fázisban mérhető antioxidáns különbségekre:

epikatechin-gallát = epigallokatechin-gallát = epikatechin-7-katechin > epigallokatechin > galluszsav

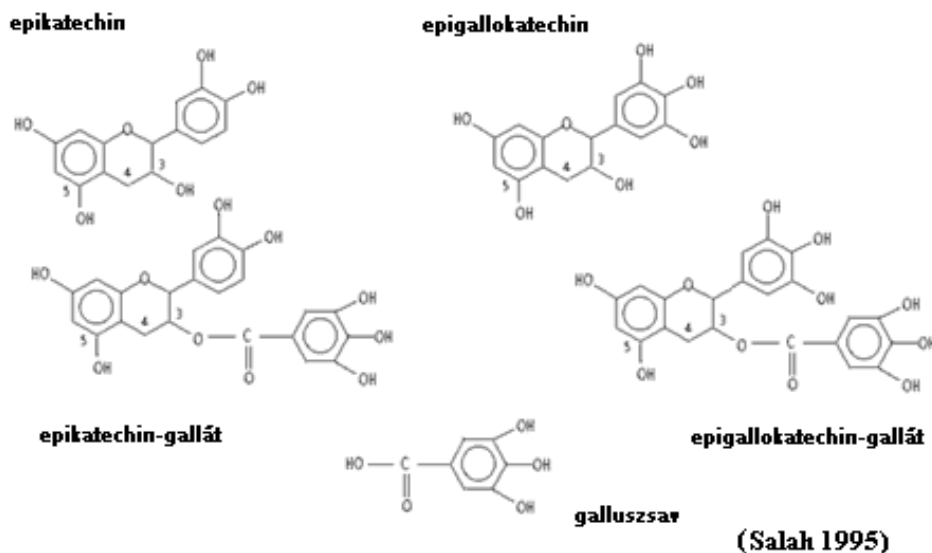
(Salah 1995).

Érdekességgént megemlíthető, hogy a brandy készítésénél az érlelés során a tölgyfahordóból kerülnek a cserzőanyagok, az úgynevezett ellágtanninok az italba, melyek az állás során ellágsavakká alakulnak. A polifenol polimer ligninek csak öreg italokból mutathatók ki (Okuda 1991).

A 21. ábrán a vízben oldódó polifenolos vegyületek szerkezete látható.

21. ábra

Antioxidáns hatással bíró, vízben oldódó polifenolok



A flavonoidok emberi szervezetre gyakorolt hatásait illetően azonban még mindig kevés információ áll rendelkezésünkre (Kellis 1984, Kimura 1985, de Whalley 1990, Frankel 1991, 1993). E vegyületek számosa biológiailag releváns pH-n autooxidálódik és kémiai reakcióiban toxikus az állati és humán sejtekre in vitro (Hardigree 1978, MacGregor 1978, Willhite 1982, Brown 1979). A flavonoid típusú kvercetin nagy koncentrációban in vitro kísérletekben DNS-mutációkat okoz annak ellenére, hogy epidemiológia tanulmányok tanúsága szerint az e vegyületet tartalmazó élelmiszerek tartós fogyasztása az érlesszedés és az infarctus megelőzésében jelentős. A kutatók ezért a különböző fenolos vegyületek széles körű vizsgálatát végzik annak felderítésére, hogy maguk az alapvegyületek, vagy azok metabolitjai felelősek-e az eltérő hatásokért (Kuppusamy 1990, Morand 1998, Nielsen 1998).

A (+)-cyanidanol-3-at, mely a Catergen hatóanyaga több évig alkoholisták májbetegségének kezelésében alkalmazták antioxidáns tulajdonsága miatt, azonban a gyógyszer több olasz beteg haemolyticus anaemiáját, és halálát okozta, így visszavonták a gyógyszerári forgalomból. Saját korai kutatásainkban igazoltuk az antioxidáns hatás mellett a vegyület Na^+K^+ -ATP-áz és Mg^{++} -ATP-áz gátló hatását is (Slater, Blázovics 1986, 1989a).

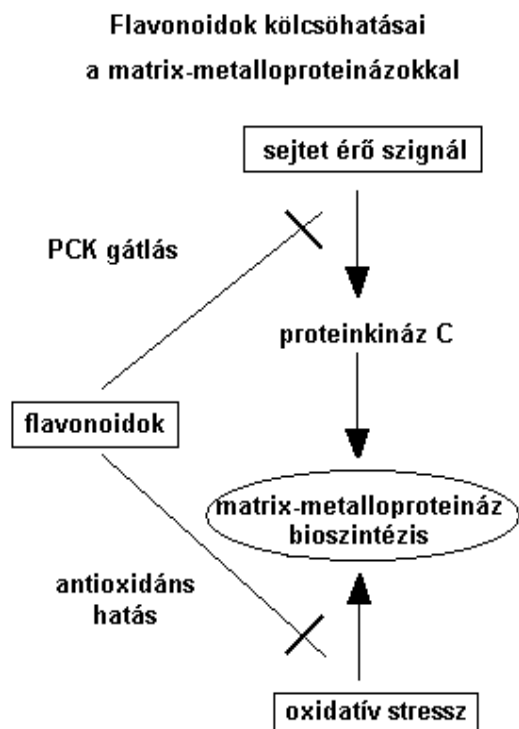
Az antioxidáns flavonoid-glikozidok rosszul szívódnak fel a béltraktusból, míg az aglikonok közvetlenül is felszívódhatnak. A változatlan szerkezetű flavonoidoknak kevesebb, mint 1 %-a éri el a keringést. A növényi kivonatok per os alkalmazásakor a flavonoid glikozidok a terminális ileumban és a colonban kolonizálódott bélbaktériumok hatására jelentős változásokon mehetnek keresztül (Hertog 1993, Hollman 1995, Breinholt 1999). Az intenzív anyagcsere következtében

fenolsavak keletkeznek, melyek felszívódásuk után további átalakulásokon mehetnek keresztül (kettős kötések telítése, dekarboxiláció, demetiláció). A vastagbélben a bakteriális β -glükozidáz hatására szabaddá váló aglikonok a felszívódást követően konjugálódnak, metilálódnak vagy glükuronidálódnak (Manach 1996, 1997, Hollman 1995). A flavonoidok metabolizálódásának legfőbb helye a máj, a bél, de a vese szerepe sem kizárt. Állatkísérletekben irodalmi adatok szerint a rutin felszívódási vizsgálatok során sem a rutint, sem aglikonját a kvercetin nem tudták kimutatni a vérből és a vizeletből, viszont azonosították a 3,4-dihidroxitoluol, 3-hidroxifenilecetsav, 3,4-dihidroxifenilecetsav és 3-metoxi-4-fenilecetsav metabolitokat. Humán tanulmányokban, ileostomizált betegekben a flavonoidok részleges abszorpcióját tapasztalták (Mole 1990, Hollman 1995, 1996, Manach 1996, 1997).

A bioaktív polifenolok és ezen belül a flavonoidok antioxidáns tulajdonságuk mellett számos metabolikus és katabolikus utat befolyásolhatnak. Részt vehetnek a fehérjeszintézis szabályozásában. A silibinin a sejtmagba jutva például stimulálja a polimeráz-A aktivitását és fokozza a riboszomális RNS transzkripcióját, fokozza a fehérjeszintézist (Sonnenbichler 1984, 1986, 1988). A silibinin SOD-aktivitást fokozó képessége is ismert (Hagymási 2004). A silibinin izomerek cholericus hatása összefügg azok laxatív hatásával.

Számos tudományos vizsgálat igazolja, hogy a táplálkozási antioxidánsok együttes alkalmazása kedvezőbb hatást eredményez, mintha külön-külön történne ezeknek az anyagoknak a bevitel. A karotinoidok a koenzim-Q és a flavonoidok között szinergizmust írtak le. A C-vitamint a flavonoidok regenerálják, de ismert a flavonoidok és E-vitamin egymást erősítő hatása is (Packer 1979, Fehér 2002). A flavonoidok és vitaminok szinergista kölcsönhatása immunstimuláns és antikarcinogén.

Mai ismereteink szerint a táplálkozási rostanyagok protektív hatásúak a vastagbél-tumorok kialakulása vonatkozásában. A lignánok (minor ballasztanyagok), melyek antioxidáns tulajdonsága is bizonyítást nyert, a gabona- dió- és zöldségfélékben találhatók. A lignánok és az E-vitamin között szinergizmust is igazoltak (Yamashita 1992, Fejes 2000). Antikarcinogén, antibakteriális, antivirális és inszekticid hatásúak. Bélbaktériumok hatására lebomlanak és belőlük enterolaktonok keletkeznek, melyek a vizelettel és a széklettel ürülnek. Az emészthető rostanyagok lebomlásának következtében a csökkenő pH-érték gátolja a másodlagos epesavak képződését és ezáltal a szekunder epesavak tumort kiváltó hatását. A savas vegyhatás és a primer epesavak együttesen gyorsítják a salakanyagok tranzitidejét a vastagbélben. A rostanyagok csökkentik az ösztrogén enterohepaticus körforgását is. Ezek a kedvező hatások megakadályozzák a vastagbél-tumorok kialakulását, ill. a daganat növekedésének gátlását eredményezik (Sréter 1998).



A 22. ábra szemlélteti a flavonoidok közvetett hatását a matrix-metalloproteinázokra.

2.7.3. Antioxidánsok hatása a prosztanoidok és citokinek képződésére

A T- és B-limfociták 4,1 és 6,0 $\mu\text{g}/10^9$ sejt mennyiségben tárolnak E-vitamint, ami azt bizonyítja, hogy az immunfunkciókhoz nélkülözhetetlen az E-vitamin. E-vitamin hiányában csökkent fagocita-aktivitást figyeltek meg (Boxer 1979, Chan 1996), viszont E-vitaminkezelésre felerősödik a celluláris és humorális immunválasz. Az immunválasz erősítésében azt feltételezik, hogy az E-vitamin szuppresszálja az arachidonsav-anyagcserét (Dinarello 1990). Ismert, hogy a silybin, silydianin és silychristin, a silibinin izomerjei prosztaglandinszintetáz-gátlók (Fiebrich 1979). Telítetlen zsírsavak fogyasztásakor nő az E-vitaminigény, ami a lipidperoxidáció elleni védelmet hivatott biztosítani (Tengerdy 1990). Az E-vitamin képes módosítani a sejt-sejt közötti kölcsönhatásokat, hiánya jelentősen befolyásolja a sejtfelszíni receptorok működését (Devaray 1996). Mitogének által stimulált limfociták és granulociták proliferációja nő E-vitaminkezelésre (Moriguchi 1993). A plazma E-vitaminszintje függ a lipidstátustól (Ernster 1993). A lipidekben (koleszterin és triglicerid) gazdag diéta szupprimálja a mitogénindukált lépsejtblasztosodást, csökkenti a lép makrofágok TNF- α -aktivitását. A makrofágok IL-1-termelését azonban nem befolyásolja (González-Cabello 1992/1993, Fehér 1996). E-vitaminkezelés megszünteti a zsírdús diéta szuppresszív hatását a lépsejt blasztogenesisére, viszont sem a TNF- α -, sem az IL-1-aktivitást nem befolyásolja.

Már számos polifenolról bebizonyították, hogy részt vesz a celluláris antioxidáns hálózatban. A molekuláris mechanizmusok felderítése napjaink új kutatási iránya. Értékes adatok jelentek meg a *Pinus maritimából* nyert többkomponensű pknogenol (katechin, epikatechin, taxifolin, koffein, ferulasav, procianidin / proantocianidin, és más fenolsavak) NF- κ B- és AP-1-aktivitást gátló hatásáról TNF-ral stimulált endothelsejteken. Ezek a vegyületek megtalálhatók a zöld- és feketeteákban, valamint a vörösborokban is (Packer 1999). A flavonoidok a matrix-metalloproteinázok hatásos inhibitorai. A glikoziláció fokozza a gátló hatást (Gebhardt 2004).

A C-vitamin és az E-vitamin fokozzák a limfociták aktivitását idősokban, és erősítik az immunrendszert. Az E-vitamin növeli az IL-1-termelést és gátolja a PGE₂-szintézist (Bendich 1984, Meydani 1991). A D-vitamin pótlása idősokban növeli az IFN- α - szintet, és ezáltal befolyásolja az NK-sejteket (Russel 2000). A D-vitamin, a retinsav és az IL-12 együtt antineoplastikus hatást eredményez, mert gátolja a tumorsejtek által indukált angiogenezist (Polya 2002). A kvercetin gátolja a lipoxigenázok aktivitását, ezáltal antiinflammatorikus hatású. Hasonlóan gyulladáscsökkentő a COX₂-blokkoló és iNOS-indukáló kempferol is. E vegyületek in vitro és in vivo antioxidáns tulajdonsága igazolható volt (Polya 2002, Blázovics 2000).

IBD-ben a plazmában a retinol, az α - tokoferol, likopén, β -kriptoxantin és a β -karotin szignifikánsan kisebb koncentrációit találták, míg a lutein, zeaxantin és az α -karotin koncentrációja nem különbözött az egészséges emberekéitől. Az C-vitamin koncentrációja a mucosában szintén kisebb volt, mint az egészségesekben (D'Odorico, 2001, Buffinton 1995, 1995a). Szignifikánsan alacsony volt a szérum A-vitamin szintje terminális ileitisben, colorectalis polyposisban, illetve különböző malignus folyamatokban is (Mózsik 2001).

Sok kutató feltételezi, és az előző fejezetekben tárgyaltak alapján részben igazoltnak látszik, hogy ezeknek az antioxidánsoknak a pótlása kedvező lehet számos betegség terápiájában (Mózsik 2001, Blázovics 2003, D'Odorico 2001).

3. MÓDSZEREK ÉS ANYAGOK

Kutatásainkhoz az alábbi engedélyekkel rendelkezünk: TUKEB 24/1996, TUKEB 59/1996, TUKEB 1/1997, TUKEB 186/1998, TUKEB 175/1998, TUKEB 69/2000, TUKEB 153/2000, IKEB 5/2003, Pest Megyei Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás 770/004/04

3.1. Állatkísérletek

Kísérleteinket 6-8 hetes hím Wistar albino patkányokkal és 1-6 hetes húscsirkékkel végeztük.

3.1.1. Alimentáris hyperlipidaemia-modell patkányokon

Az általában 9-14 napig tartó kísérletek során kísérletenként különböző számú 150-200 g-os hím Wistar patkányt használtunk fel. Az egyes fejezetekben részletesen leírtam a kísérleti programot, tekintettel arra, hogy az elmúlt 20 év alatt különböző állatházakban kezeltük az állatokat, így a körülmények és lehetőségek eltérőek voltak.

A patkányok különböző, kereskedelmi forgalomból származó LATI, Charles River, CRLT-N (Biofarm Prompt Kft. Gödöllő) alaptápot kaptak és az alimentáris hyperlipidaemia kialakítása érdekében ezekhez a tápokhoz kevertük a 2 % koleszterint, 0,5 % kólsavat és 20 % napraforgóolajat, amelyet bolti forgalomból szereztünk be.

A hatóanyagokat vagy a táphoz vagy az itatóvízhez adtuk, illetve szondán vagy i.p. injekció formájában juttattuk be az állatokba. Előnyben részesítettük a táplálkozással történő kezeléseket. Az állatok életének kioltása mély narkózisban történt dekapitálással. Narkotikumként Urethant és Nembutalt alkalmaztunk a készítményeken feltüntetett ajánlott dózisban.

A kísérletek során betartottuk a WHO és a Helsinki Deklarátum követelményeit (Magyar Közlöny 1998).

Az állatokat a Semmelweis Egyetem Gerontológiai Központ, a II. Belgyógyászati Klinika, az I. és II. Anatómiai Intézet és a MTA Központi Kémiai Kutatóintézet, a Herceghalmi Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet állatházaiban tartottuk és kezeltük (Blázovics 1992).

3.1.2. Kísérletek húscsirkékkel

A nehézfémion-terhelési kísérleteket a Herceghalmi Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézetben végezték. A máj és epemintákat megfelelő előkészítés után tanulmányoztuk. A kísérlet leírása a 4.5.1. fejezetben található (Blázovics 2002).

3.2. Állatműtétek

A kísérletek során az állatok ellátása és gondozása „Az állatok védelméről és kíméléséről” c. 1998. évi XXVIII. Törvény által előírtakkal összhangban történt.

3.2.1. Ductus choledochus kanülálása patkányokban

A patkányokat (180 - 200 g) mély Nembutal-anaesthesiában (pentobarbital 35 mg/ttkg i.p.) operáltuk. Median laparotomia után, a középső májleány felemelésével, illetve a duodenum előhúzásával láthatóvá váló közös epevezeték, az utolsó lobaris epevezeték beömlésétől distalisan kanüláltuk (Blázovics 1997a).

3.2.2. Partialis hepatectomia patkányokban

A hím Wistar patkányokat (200 ± 10 g; $n = 24$) mély éter-anaesthesiában operáltuk. Lokális érzéstelenítésre 0,5 ml 1 %-os Lidocain injekciót alkalmaztunk. Median laparotomia után, a lobus sinister medialis, lobus sinister lateralis és lobus dexter medialis kiemelését követően, a hárttyák óvatos átvágásával a lebenyeket lekötöttük, majd eltávolítottuk. A 70 %-os partialis hepatectomia után a csonkot és a hasüreget antibiotikummal (ampicillin, penicillin) befecskendeztük, majd a hasfalat zártuk. A háromnapos túlélés után az állatokat ismét elaltattuk, és mély narcosisban a hasfal megnyitását követően az abdominalis véna punkciójával elvégeztettük. Az álműtött állatoknál csak laparotomiát végeztünk. Egyéb ellátásuk azonos volt a műtött állatokéval. (Blázovics 1993a, 2002).

Hat állat *Sempervivum tectorum* extratum kezelést kapott (2 g/ttkg) ad libitum az itatóvízben a műtétet megelőző 5 napon keresztül, majd a műtétet követő három napig. Az állatok máját, lépét és véréit további feldolgozásra előkészítettük.

3.3. Szövetpreparátumok készítése

3.3.1. Májhomogenizátum készítése

Kísérleteinkben hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatok életének kioltása után jeges hűtés mellett a kivéreztetett májat aprítottuk, és izotóniás KCl-oldattal mostuk, majd a vértől megtisztított májdarabkákat Potter-Elvehjem készülékben homogenizáltuk. A vizsgálatokhoz izotóniás KCl-oldattal 10 mg/ml fehérjetartalmú szuszpenziókat készítettünk.

3.3.2. Mikroszóma izolálása májból

Kísérleteinkben a 3.3.1. alatt leírt módon homogenizátumot készítettünk. A 30 %-os homogenizátumokból differenciál-centrifugálással eltávolítottuk a sejtmag és mitokondrium frakciókat, majd a felülúszóból 1 órán át 100000 g-vel történő ultracentrifugálással (VAC 60 Janetzky) mikroszómát preparáltunk (Jordan 1982).

3.3.3. Bélmucosa-homogenizátum készítése

A patkányok duodenum, jejunum, ileum, coecum, colon, rectum bélszakaszainak azonosítása után az adott bélszakaszokat kivágtuk, majd az elkülönített szakaszokból a béltartalmat óvatosan kinyomtuk, és bélsármentesre mostuk izotóniás KCl-oldattal. A tiszta bélmucosát a bél külső felszíne felől erőteljes nyomással eltávolítottuk.

3.4. Enzimaktivitás- és metabolitkoncentráció-meghatározások

3.4.1. Enzimaktivitás és metabolitkoncentráció-meghatározások vérből

A citrátos plazmából vagy szérumból történtek a meghatározások. Meghatároztuk az alkalikus-foszfataz (ALP), alanin-aminotranszferáz (ALT/GPT), aszpartát-aminotranszferáz (AST/GOT), gamma-glutamil-transzferáz, (GGT), karbamid (BUN), kreatinin (CREA), amiláz (AMY), totál-

protein (TP), vércukor (GLU), koleszterin (CHOL), HDL-koleszterin, triglicerid (TG), összbilirubin (TBIL), epesav (ES), húgysav (UA) paramétereket rutin laboratóriumi módszerekkel, Hitachi 717 klinikai automatával. A glikált hemoglobin (HbA_{1c}) meghatározása Randox kittel 700 nm-en történt.

3.4.2. Enzimtartalom- és enzimaktivitás-meghatározások májból

3.4.2.1. Citokróm P450-tartalom meghatározása

A citokróm P450-tartalom meghatározásakor a mikroszomális fehérjekoncentráció 2mg/ml volt. A mérést 0,1 M foszfátpufferben (pH 7,0) végeztük Omura és Sato módszerével (1964, 1964a). A CO-dal telített és ditionittal redukált mikroszóma differenciaspektrumát 550 nm-en regisztráltuk. A molekuláris extinkciós koefficiens $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.4.2.2. Citokróm b5-tartalom meghatározása

A citokróm b5 mennyiségének meghatározását Omura és Sato módszerével (1964, 1964a) végeztük foszfátpufferben (pH 7,0). A NADH-val (0,2 mM) redukált és légtelenített mikroszómák differenciaspektrumának felvétele 424 nm-en történt. A moláris extinkciós koefficiens $185 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.4.2.3. Citokróm c-reduktáz aktivitásának meghatározása

A rendszer 0,1 M Tris.HCl-puffert (pH 7,5), 60 μM citokróm c-t, 80 $\mu\text{g/ml}$ mikroszomális fehérjét és 0,4 mM NADPH-t tartalmazott. A referencia-küvetében nem volt NADPH. A meghatározást 550 nm-en végeztük. Az extinkciós koefficiens $19,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A mérést Jansson és Schenkman szerint hajtottuk végre (1977).

3.4.2.4. Ferricianid-reduktáz-aktivitás meghatározása

A mérés kivitelezéséhez 0,1 M Tris.HCl-puffert (pH 7,5) használtunk, amely 200 μM K₃(Fe(CN)₆)-ot és 80 $\mu\text{g/ml}$ mikroszomális fehérjét tartalmazott. A reakciót 0,4 mM NADH-val indítottuk. 420 nm-en Jansson és Schenkman szerint (1977) mértük a reakciót.

$1,02 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ moláris extinkciós koefficienssel számoltunk.

3.4.2.5. Kataláz aktivitásának meghatározása

Az enzim aktivitását patkánymáj-homogenizátumból, patkány- és humán vörösvértestekből mértük. A meghatározás Beers és Sizer (1952) leírása szerint történt pH 7,0-es foszfátpufferben 10 mM hidrogén-peroxid jelenlétében. A hidrogén-peroxid bomlását 240 nm-en 3 percig követtük. Az eredményt Bergmeyer egységben adtuk meg. (egységnyi fehérjére vonatkoztatva egységnyi enzimaktivitás 1 g H₂O₂-ot bont el 1 perc alatt 25 °C-on).

3.4.2.6. Glutation-peroxidáz aktivitásának meghatározása

A glutation-peroxidáz aktivitását patkánymáj-homogenizátumból és patkány, valamint ember vörösvértestekből határoztuk meg. Chin és munkatársai (1976) módszerének Sedlak és Lindsay (1985) által történt módosítása alapján. Az ismeretlen aktivitású enzimminta az 50 mM-os Tris-

HCl-pufferben (pH 7,5) 0,2 mM redukált glutation kumén-hidroperoxiddal (0,33 mM) történő oxidációját katalizálja. A reakcióban megmaradó redukált glutation mennyiségét Ellman reagenssel 412 nm-en határoztuk meg. Egy egységnyi glutation-peroxidáz 1 perc alatt 1 μ mol redukált glutationt bont el egységnyi mennyiségű fehérjére vonatkoztatva.

3.5. Redoxi-paraméterek meghatározása különböző szövetekből

3.5.1. Redukálóképesség meghatározása

A redukálóképességet Oyaizu (1986) szerint határoztuk meg. Biológiai minták (plazma, szérum, 10 mg/ml fehérjetartalmú szöveti homogenizátum) esetében 200 μ l mintát használtunk és bidesztillált vízzel 1 ml-re egészítettük ki a térfogatot, majd 2,5 ml pH 6,6 foszfátpufferrel (0,2M) és 2,5 ml 1 %-os $K_3Fe(CN)_6$ -oldattal elegyítettük, ezután 20 percig 50 °C-on inkubáltuk. 2,5 ml 10 %-os triklórecetsav-oldat hozzáadása után a reakcióelegyet 10 percig centrifugáltuk 2500 rpm-mel. A felülúszó 2,5 ml-ét 2,5 ml bidesztillált vízzel összekeverve, majd 0,5 ml 0,1 %-os $FeCl_3$ -oldatot hozzáadva, a kialakult szín intenzitása 700 nm-en mérhető, és arányos a minta redukálóképességével. Referencia vegyületként aszkorbinsavat használtunk. A minta redukálóképességét aszkorbinsav ekvivalensben (ASE) adtuk meg. 1 aszkorbinsav ekvivalens az egységnyi térfogatú minta (1 ml) redukálóképessége, ha hatása egyenértékű 1 μ mol aszkorbinsavval.

3.5.2. H-donor-aktivitás meghatározása

A H-donor-aktivitást Blois (1958) módszerének kis módosítása (Blázovics 1999a) alapján 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil stabil gyök jelenlétében mértük 517 nm-en spektrofotometriásan. A DPPH stabil szabad gyök. A vegyület H-donor molekulák jelenlétében H-t vesz fel, és így abszorbanciája csökken. Biológiai minták esetében a vizsgálathoz 50 μ l 10 mg/ml-es bovin szérumalbuminra beállított májhomogenizátumot, plazmát, ill. szérumot használtunk, és térfogatát 950 μ l bidesztillált vízzel kiegészítettük 1 ml-re, majd 1 ml metanolt adtunk hozzá. Ehhez 500 μ l metanolos DPPH-oldatot (9 mg DPPH 100 ml metanolban oldva) adtunk, és alapos összekeverés után a reakcióelegyet 30 percig 37 °C-on inkubáltuk. 10 perces centrifugálást (3000 rpm) követően olvastuk le az abszorbanciát 517 nm-en metanol vakkal szemben. Az eredményt gátlás %-ban adtuk meg. $Gátlás \% = [Abs(kontroll) - Abs(minta)] / Abs(kontroll) \times 100$

3.5.3. Össz-scavenger kapacitás meghatározására

3.5.3.1. Kemiluminometriás mérések plazmából és vörösvértestből

Berthold Lumat készülékkel

Az össz-scavenger kapacitás meghatározására kemilumineszcenciás módszert alkalmaztunk Blázovics és mtsai (1999a) szerint. A reakcióelegy hidrogén-peroxidot, luminolt és mikroperoxidázt tartalmazott. A mérés elve az, hogy a luminol szabad gyökök hatására

gerjesztődik és fényt bocsát ki, amelyet luminométerben lehet detektálni. A fényintenzitás csökkenthető gyökfogó vegyületek hatására. Az eredményeket relative light unit (RLU) egységben adtuk meg. A részletes leírás a 4.4. fejezetben olvasható.

3.5.3.2. Kemiluminometriás mérések máj- és bélmucosa-homogenizátumokból, valamint epéből Berthold Lumat készülékkel

A meghatározások során a 3.5.3.1 fejezetben alkalmazott reakcióelegyekkel végeztük a méréseket. A máj- és bélmucosa-homogenizátumok fehérjetartalmát Lowry és mtsai (1951) módszerével bovin szérumalbuminra nézve 10 mg/ml, ill. 5 mg/ml koncentrációjára állítottuk be, majd ezekből a mintákból a mérések során azonos térfogatokat (50-100 µl) vittünk be a mérőrendszerbe. Az epemintákat hígítatlan, illetve 10x 100x és 1000x vizes hígításban vizsgáltuk. A bevitt térfogat 50-100 µl között volt.

3.5.3.3. Kemiluminometriás mérések májhomogenizátumokból

Medicor-Medilab készülékkel

A kemilumineszcencia intenzitását mV-ban mértük. A műszert úgy állítottuk be, hogy maximális kitérése 10 mV-nak feleljen meg. A reagens összetétele 0,7 mM luminol, 3,8 µM hemin, 11,8 mM Na₂CO₃ volt. A pH-t 10-11 közöttire állítottuk be. A kész oldatot öt percen át N₂ gázzal átbuborékolattuk, és a mérések kivitelezéséig sötét üvegben tartottuk. A reakcióelegyet Heide (1986), és Zsinka (1988) szerint készítettük el.

A mérések során 25 %-os, bidesztillált vízzel készített homogenizátumból dolgoztunk. Az osztott küvetta alsó terébe 1 ml homogenizátumot, a felső kehelybe 200 µl reagenst pipettáztunk. A mintákat 5 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd 37 °C-on mértük (Zsinka 1988).

3.5.4. Totál antioxidáns státusz

A mérést Randox TAS kittel végeztük. A meghatározás lényege, hogy a metmioglobinnál hidrogén-peroxid hatására keletkező ferrilmioglobin-gyök a kromogén 2,2'-azino-bisz-(3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsavval (ABTS) stabil kékes-zöld színű ABTS[•] gyök keletkezése közben reagál. A vegyület abszorbanciamaximuma 660 nm-en van. A gyökfogó vegyületek meggátolják a metmioglobin oxidációját, vagy közömbösítik a ferrilmioglobin-gyököt. Standardként Troloxot használunk.

3.6. Lipidperoxidációs paraméterek meghatározása

3.6.1. Diénkonjugátum-koncentráció meghatározása májból

A májhomogenizátumok lipiddtartalmát izo-oktánnal (1g/5ml) extraháltuk, majd 20 óra elteltével a levegőtől elzárt szobahőmérsékletű minták diénkonjugátum-tartalmát 232 nm-en az AOAC (1984) útmutatása szerint határoztuk meg.

3.6.2. Diénkonjugátum-koncentráció meghatározása epéből

Az epe (0,5 ml) víztelenítését 1 mg vízmentes Na_2SO_4 hozzáadásával érték el. 2 ml izo-oktánnal extraháltuk a lipidfrakciót, majd 5000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk. A visszamaradt pelletet 2x egymás után 1,25 ml izo-oktánnal újra kiráztuk, és az előbbi módon centrifugáltuk. A frakciókat egyesítettük. A meghatározást a továbbiakban az AOAC (1984) leírása szerint végeztük.

3.6.3. Malondialdahid-koncentráció meghatározása

3.6.3.1. Enzimatisuk úton kiváltott lipidperoxidáció

A reakcióelegy 20 mM Na-foszfátpuffert (pH 7,5), 0,15 M KCl-ot, 50 μM FeCl_3 -ot, 50 μM Na-pirofoszfátot, 1 mg/ml fehérjét, regeneráló rendszerként 0,6 IU glükóz-6-foszfát-dehidrogenázt, 10 mM glükóz-6-foszfátot, 0,5 mM NADPH-t, valamint különböző koncentrációban a vizsgálandó vegyületeket tartalmazta. A reakcióelegy térfogata 0,5 ml volt. A méréseket Jordan és Schenkman szerint végeztük (1982).

3.6.3.2. Tiobarbitursav reaktív anyagok mérése szérumban és epében

A meghatározást Pyles (1993) szerint végeztük. Ezzel a módszerrel minimálisra csökkenthető a zavaró bilirubin és hemoglobin színreakció. 0,15 ml szérumhoz, illetve epéhez 10 μl 100 mM deszferál-oldatot adtunk, majd 1ml-re kiegészítettük 0,9 %-os NaCl-oldattal. A reakcióelegyhez 4 ml TBA-reagenst adtunk (TBA-reagens: 0,25 N sósavban 92 mM triklórecetsavat és 26 mM tiobarbitursavat tartalmaz) és 95 °C-on 80 percig inkubáltuk. A kialakult színt 4 ml extrakciós-oldat (n-butanol:desztillált víz: piridin, 15:3:1) hozzáadása után a szerves fázisba ráztuk ki, majd lecentrifugáltuk, és a felülúszóból végeztük a spektrofotometriás meghatározást 510, 532 és 560 nm-en. Vaknak az extrakciós-oldatot használtuk.

Számolás: $\text{MDA}_{532} = 1,22 \times [(A_{532}) - (0,56 \times A_{510}) + (0,44 \times A_{560})]$

3.6.4. Szabad szulfhidrilcsoportok meghatározása

Ellman és Lysko (1967) módszere szerint határoztuk meg a szabad szulfhidrilcsoportok koncentrációját. 5,5-ditiobisz-nitrobenzoesav reagenssel pH 7,4 Na-foszfátpufferben 512 nm-en. Standardként redukált glutationt használtunk.

3.6.5. Oxidált lipidek kimutatása

Az oxidált lipidek kimutatása vékonyréteg-kromatográfiásan történt. A kloroform-metanol-ecetsav-víz 25:15:4:2 arányú elegyében végzett futtatást hexán-éter-ecetsav 90:10:1 elegyében folytattuk a réteglap felétől POLYGRAM Sil G/UV 254 lemezen. Az előhívás 5 %-os foszformolibdénsav tartalmú etanollal történt 105 °C-on 10 percig. A kromatogramokat CHROMOSCAN denzitométerrel értékeltük ki (Kates 1975).

3.7. Fémionanalízis

3.7.1. Mintaelőkészítés

Fémiononanalízist végeztünk drogokból, növényi extraktumok liofilizátumaiból és különböző állati (máj, epe) és emberi (vér, vörösvértest) szövetekből.

A mintákból 500-500 mg-ot mértünk be teflonbombába, majd 5 ml 65 %-os salétromsav és 2 ml hidrogén-peroxid elegyében roncsoltuk. A feltárt mintákat 25 ml-es mérőlombikba öntöttük, bidesztillált vízzel jelig töltöttük. A makroelemek koncentrációjának meghatározásához tízszeres hígítású oldatokat készítettünk. Minden mintából három párhuzamos bemérés, ill. mérés történt. A kapott eredményekből átlagot és szórást számoltunk.

3.7.2. Mérés ICP-OES-rel

Az elemtartalmak mérésére Thermo Jarrell Ash Corporation gyártmányú Atom Scan 25 ICP-t (induktív gerjesztésű plazma emissziós spektrométert) használtunk, melyben 2 kW teljesítményű rádiófrekvenciás generátor (27,12 MHz) által indukált 8000-10000 °K-os argonplazma gerjesztődik. Optikai rendszere Czerny-Turner vákuum-monokromátorból és két fotoelektron-sokszorozóból (R 427 és R 889) épül fel, optikai rács: 2400 és 1200 vonal/mm. Mérési tartománya 160 nm-től 850 nm-ig terjed. Optikai felbontóképessége: 160 nm-től 335 nm-ig 0,008 nm; 335 nm-től 670 nm-ig 0,018 nm; 670 nm-től 850 nm-ig 0,04 nm. A készülék standardizálásához a mintákból készített oldatokhoz hasonló összetételű és mátrixú Merck atomabszorpciós és ICP standardokból készült oldatokat használtunk. Két pontos kalibrálást, 3x3 másodperces integrálási időt, háttérkorrekciót és automatikus vaklevonást alkalmaztunk (Szentmihályi 2000, 2002).

3.8. Egyéb biokémiai és immunológiai módszerek

3.8.1. Limfocitaproliferáció

A patkánylép perfúziójával nyert sejteket RPMI 1640 szövetkultúra-médiumban szuszpendáltuk, amely 10 % hőinaktivált főtális borjúsérumot, 25 mM HEPES-puffert, 2 mM L-glutamint, 100 IU/ml penicillint, 100 µg/ml gentamycint, 7,5 µg/ml amphotericin-B-t tartalmazott. 200 µl térfogatban 4×10^5 sejtet pipettáztuk „flat bottomed microplate“ lemezre. Négy paralellt készítettünk. A sejtekhez 1, 5 és 10 µl/ml koncanavalin-A-t adtunk. A kontrollokhöz nem adtunk lektint. A lemezeket 37 °C-on 5 % CO₂-ot tartalmazó nedves légtérben 72 órán keresztül inkubáltuk, és 48 órás inkubálás után 4 µl ³H-thimidinnel kezeltük. A sejteket szeparáló automatával filterpapíron összegyűjtöttük és az izotóp meghatározást liquid-scintillációs számlálóban (Nuclear Chicago Isocap 300, (USA) végeztük. Az eredményeket cpm-ben adtuk meg (Gonzalez-Cabello, R., 1987).

3.8.2. Lépsejtpreparálás

A patkányok lépsejtjeit Müzes és munkatársai szerint (1989) izoláltuk. A makrofágokat 24 lyukú adherens plasztik lemezen 10×10^6 sejt/ml koncentrációban 2 órán át 37 °C-on 5 % CO₂ -ot tartalmazó nedves légtérben kitapasztottuk. A nem kitapadt sejteket erőteljes mosással

(szövetkultúra-médium) távolítottuk el. A kitapadt sejteket összegyűjtöttük, kétszer mostuk, majd reszuszpendáltuk RPMI 1640 médiumban, és a sejtszámot $1,5 \times 10^6$ sejt/ml-re állítottuk be.

3.8.3. IL-1- és TNF- α -release kiváltása

Az izolált lépsejteket 20 μ g/ml E. coli 0111:B4 LPS-dal (lipopoliszacharid) inkubáltuk. 24 óra után a sejtmentes felülszót centrifugálás után összegyűjtöttük és steril szűrőn átszűrtük (0,22 μ m Millipore, USA). A mintákat a meghatározásig -20°C -on tároltuk.

3.8.4. IL-1-aktivitás meghatározás

Az IL-1 meghatározáshoz az előzőekben leírtak szerint készült szupernatánst használtuk és a méréshez 5-7 hetes C3H/HeJ egerek timocitáit használtuk fel. Az egyszerű sejtszeparálás után a sejtszámot $1,5 \times 10^6$ sejt/cső-re állítottuk be és 48 órán át 37°C -on nedves légterben 1.0 μ g/ml Con-A-val inkubáltuk a vizsgálandó szupernatánssal együtt. Az inkubálás végeztével 18 órán át 0,4 μ Ci/cső ^3H -timidinnel folytattuk tovább az inkubálást megfelelő kontrollminták mellett. A sejteket végezetül filteren összegyűjtöttük és a timidinbeépülést liquid-scintillációs számlálóban Nuclear Chicago Isocap 300 (USA) határoztuk meg. Az eredményeket cpm-ben adtuk meg.

3.8.5. TNF- α -citotoxicitás meghatározása

TNF- α -citotoxicitás meghatározását HEp-2 célsejteken Müzes és munkatársai módszere (1989a) szerint végeztük. Cincinnati HEp-2 adherens humán epipharynx carcinoma célsejteket tenyésztettünk 10 % hőinaktivált főtális borjúsérum, 25 mmol/l HEPES, 2 mmol/l L-glutamin és antibiotikum kiegészítésű Eagle's MEM-ben. Az elpusztult sejtek felülszóval történő eltávolítása után a HEp-2 sejteket 0,5 ml 0,1 % tripszint tartalmazó TC 199 médiumban reszuszpendáltuk és kétszer mostuk. A reszuszpendált HEp-2 célsejteket ($2,5 \times 10^3$ sejt/cső) 96-lyukú "flat bottom microtiter plate"-re vittük és 4 μ Ci/cső triciált timidinnel kezeltük. A tesztelni kívánt szupernatánst hozzáadtuk a sejtekhez, és 24 órán át 37°C -on inkubáltuk 5 % CO_2 -ot tartalmazó nedves légterben megfelelő kontroll mellett. A beépült radioaktivitást az előzőekben leírtak szerint határoztuk meg. Hat párhuzamos mérést végeztünk. A citotoxicitást %-ban adtuk meg.

3.8.6. Citokinek meghatározása kitekkel

3.8.6.1. IL-1 β -meghatározás

Az IL-1 β kit, szilárdfázisú, enzimmal jelzett immundiagnosztikai készítmény. A mikrotitráló lemez mélyületeinek felületén kötött monoklonális humán IL-1 β -ellenanyagok reagálnak a szérum- vagy plazmamintákban levő IL-1 β molekulákkal. Az így képződött immunkomplex reagál a következő lépésben bemért anti-humán-IL-1 β tormaperoxidázzal jelzett monoklonális

ellenanyaggal. Az enzimre specifikus TMB-szubsztrát-oldattal kapott színreakciót 450 nm-en mérjük.

3.8.6.2. IL-6-meghatározás

A meghatározás lényege: szilárdfázisú, enzimmel jelzett immundiagnosztikai módszer. A kötött poliklonális humán IL-6-ellenanyagok reagálnak a szérumból vagy plazmaminták IL-6 molekuláival. A keletkezett immunkomplex a következő lépésben anti-humán-IL-6 tormaperoxidázzal jelzett monoklonális ellenanyaggal reagál. Az enzimre specifikus TMB szubsztráttal kapott színreakció 450 nm-en mérhető.

3.8.6.3. TNF- α -meghatározás

A Biosource TNF- α kit szilárdfázisú szendvics-módszeren alapul. Humán monoklonális-TNF- α -ellenanyaggal fedett lemez köti a szérumból TNF- α -t. A színreakció kialakulásához biotinilált monoklonális hTNF- α -antitestet alkalmazunk és streptavidin-peroxidázt. A leolvasás 450 nm-en történik.

3.8.7. Tumormarkerek meghatározása kitékkel

A tumormarkereket LIA-mat lumineszcens immunkémiai módszerekkel határoztuk meg.

3.8.7.1. AFP-meghatározás

A vizsgálatot, a kit leírása szerint végeztük. A módszer lényege: a szérumból monoklonális AFP-antitesttel fedett csőben megkötjük, majd anti-AFP-tracer-konjugátumot adunk hozzá. A detektáláshoz luminolos reagents használunk. Referenciatartomány: 6 ng/ml alatt.

3.8.7.2. CEA-meghatározás

A vizsgálatot, a kit leírása szerint végeztük. A módszer lényege: a szérumból CEA monoklonális antitesttel fedett csőben megkötjük, majd anti-CEA-tracer-konjugátummal reagáltatjuk. A detektáláshoz luminolos reagents használunk. Referenciatartomány: 0-4 ng/ml.

3.8.7.3. CA-19-9-meghatározás

A vizsgálatot, a kit leírása szerint végeztük. A módszer lényege: a szérumból CA-19-9-antitesttel fedett csőben megkötjük, majd anti-CA-19-9-tracer-konjugátummal reagáltatjuk. A detektáláshoz luminolos reagents használunk. Referenciatartomány: 37 U/ml alatt.

3.8.8. Glutation-peroxidáz meghatározása kittel

A meghatározás a RANSEL RS505 kit leírásában ajánlott módszer szerint történt. A módszer lényege: a glutation-peroxidáz a glutationt oxidálja kumén-hidroperoxid jelenlétében. A glutation-reduktáz és a NADPH az oxidált glutationt visszaalakítja redukált formába, és a NADP⁺ 340 nm-en mérhető.

3.8.9. Szuperoxid-dizmutáz meghatározása kittel

A meghatározás a RANSOD SD125 kit leírásában ajánlott módszer szerint történt. A módszer lényege: a SOD a xantin - xantinoxidáz rendszerben keletkező szuperoxidiont oxigénre és hidrogén-peroxidra bontja. A szuperoxid a 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil-tetrazolium-klorid)-dal reagál és vörös színű formazán keletkezik. A SOD gátolja a színképződést. A leolvasás 505 nm-en történik.

3.8.10. Epesavak meghatározása enzimatis klorimetriás kittel

A DI-45311 epesavkittel történő meghatározás lényege: NAD és 3- α -hidroxi-szteroid-dehidrogenáz jelenlétében a szérumban 3- α -hidroxi-epesavak specifikusan 3-keto-származékká alakulnak át, miközben NADH keletkezik. A NADH diafozáz által katalizált reakcióban tetrazóliumsóból formazánt képez. A színreakció 540 nm-en detektálható.

3.8.11. Vörösvértest-hemolizátum hemoglobintartalmának meghatározása

A vörösvértest-hemolizátumok hemoglobintartalmát ciánhemoglobin formában Hemisol standard és Hemisol-reagens segítségével határoztuk meg (Human Oltóanyagtermelő és Gyógyszergyártó Rt. Gödöllő). A vörösvértest-hemolizátumok hemoglobintartalmát 10 mg/ml-re állítottuk be fiziológiás sóoldattal.

3.8.12. Biológiai minták fehérjetartalmának meghatározása

A fehérjetartalmat Lowry és mtsai (1951) módszerével határoztuk meg fotometriásan 650 nm-en, standardként bovin szérumalbumint alkalmaztunk. Az eredményeket mg/ml-ben adtuk meg.

3.9. Fitokémiai analízisek

3.9.1. Spektrofotometriás meghatározások

3.9.1.1. Összpolifenoltartalom meghatározása

A drog-, tea- és liofilizátumminták összpolifenol- és cserzőanyagtartalom meghatározását a VII. Magyar Gyógyszerkönyv (Ph. Hg.VII.) előírása szerint végeztük. A bémérések: drogból 3,00 g teából 10,00 ml, a liofilizátumból 0,20 g volt. A bémért mintát 150 ml vízzel (teák esetében 140 ml) egyszeri forrásig melegítettük, majd a továbbiakban a leírás szerint jártunk el. A eredményt pirogallolban fejeztük ki.

3.9.1.2. Flavonoidtartalom meghatározása

A flavonoidtartalom a Német Gyógyszerkönyvben (DAB 10) leírt módszer alapján került meghatározásra, savas hidrolízist követő spektrofotometria segítségével 420 nm-es hullámhossz alkalmazása mellett. A növényi minták flavonoid vegyületei $AlCl_3$ -dal képzett sárga komplex formájában kerültek meghatározásra, a glikozidok és az aglikonok együttes mennyiségét hiperoxidban fejeztük ki.

3.9.1.3. Tannintartalom meghatározása

A meghatározáshoz a Ph.Hg.VIII. leírása szerint előkészített mintát bőrporral 30 percig ultrahangos fürdőben reagáltattuk. A színreakcióhoz Folin-oldatot használtunk. A fotometriás

meghatározás 720 nm-en történt. Referenciaoldatnak pirogallolt alkalmaztunk. Az összes polifenol fényabszorbanáciájának és a bőrpor által meg nem kötött polifenol fényabszorbanáciájának különbségéből kaptuk a bőrpor által megkötött polifenolt (cserzőanyagot) jelentő abszorbancia értéket.

3.9.1.4. H-donor-aktivitás meghatározása növényi mintából

A H-donor-aktivitást Blois (1958) módszerének kis módosítása (Lugasi és mtsai 1998) alapján 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil stabil gyök jelenlétében mértük 517 nm-en spektrofotometriásan.

A mintaoldatokból (lofilizátumok 1mg/ml) hígítási sort készítettünk, melyből 4 ml-ert 1 ml DPPH-oldattal (9 mg DPPH 100 ml metanolos oldata) elegyítettük. Tesztoldatnak a silibinin 10^{-3} M-os oldatát alkalmaztuk. 30 perc után (szobahőmérsékleten) 517 nm-en mértük az abszorbanciát. Az eredményt gátlás %-ban adtuk meg:

$$\text{Gátlás \%} = [\text{Abs(kontroll)} - \text{Abs(minta)}] / \text{Abs(kontroll)} \times 100$$

3.9.1.5. Redukálóképesség meghatározása növényi mintából

A redukálóképességet Oyaizu (1986) szerint határoztuk meg. Növényi kivonatok esetében 1 ml különböző koncentrációjú mintát alkalmaztunk. A továbbiakban a meghatározást a 3.5.1. pontban leírtakkal azonosan végeztük.

3.9.1.6. Komplexképző aktivitás

A minták komplexképző aktivitását Shimada és mtsai szerint határoztuk meg (1992). 2 ml pH 5,0-ös hexaminpufferhez, amely 3 mM Cu^{2+} vagy Fe^{2+} iont tartalmazott 2 ml vizsgálandó anyagot, majd 0,2 ml 1 mM-os tetrametil-murexidet adtunk. 485 és 530 nm-en vettük fel az abszorbanciaspektrumot. A réz- vagy vasionok hexametilén-tetraminnal alkotott komplexe 485 nm-en abszorbancia maximumot ad. A hexametilén-tetraminnál erősebb komplexek abszorbancia-maximuma 530 nm-nél olvasható le. A vizsgált minták komplexképző aktivitása a 485 és 530 nm-en leolvasott értékek hányadosával jellemezhető. A rendszer alapértéke $3,5 \pm 0,01$. A különböző komplexek számított értékei ennél kisebbek.

3.9.2. Kromatográfiás vizsgálatok

3.9.2.1. Fenolos komponensek vizsgálata vékonyréteg-kromatográfiával

A VRK futtatást Merck-Kieselgel 60F₂₄₅ TLC lemezen végeztük. A futtatóelegy: etilacetát:hangyasav:jégecet:víz (100:11:11:27) volt. A detektálás UV 254- és 365 nm-en történt. A kromatogramot Naturstoff reagenssel hívtuk elő. A minta előkészítésére metanolos kivonást alkalmaztunk: 1 g porított drogot 50 ml metanolban 60 °C-on 5 percig melegítettünk. A nyert tiszta szűrletből végeztük a vizsgálatot (Héthelyi 2001).

3.9.2.2. Aromás komponensek meghatározása gázkromatográfiával

A vizsgálatokat Shimadzu GC-14A és GC-14B kapillár-gázkromatográfiás készüléken végeztük 30 m hosszú x 0,25 mm belső átmérőjű x 0,25 µm filmvastagságú kvarc kapillárkolonnával (DB 1704, ill. SE-30 folyadékfilmen).

A lángionizációs detektorhoz a hidrogént generátorral, a levegőt kompresszorral állítottuk elő. Vivőgázként 99,999 nitrogéngázt 75:1 splitter aránnyal, 1 ml/min áramlási sebességgel alkalmaztunk (Héthelyi 2001).

3.9.2.3. GC/MS tömegspektrográfiás vizsgálatok

A GC/MS tömegspektrometriás vizsgálatokat Finnigen-Matt GCQ „Ion-trapp”készüléken 70 eV emissziós feszültségen végeztük. A fragmentációs adatokat m/z 40-650 tömegtartományban vettük fel. 30 m hosszú RESTEK-5 kapillárkolonnában, háromlépcsős kolonnatér programmal 42,5 perces analízisidővel készültek a felvételek. 99,9999 hélium gázzal 67:1 splitter arányú, 1 ml/min áramlású vivőgázzal végeztük az elválasztást. A mintákból kloroformos etilalkoholos extraktumokat készítettünk. 8-8 g teadrog 60+30 perces 30-30 ml-es frakcionált hideg oldószeres extrakcióját követően 40 °C-on Rotavapor készülékben 1-2-ml-re betöményítettük, majd ebből 2 µl-t vittünk fel a készülékre (Héthelyi 2001).

3.9.3. Luminometriás vizsgálatok növényi eredetű készítmények scavenger tulajdonságának meghatározására

A növényi eredetű hatóanyagok vizsgálatánál hígítási sorozatot készítettünk, és minden esetben 1 mg/ml bemérésből indultunk ki. Minden hígítási pontban több párhuzamos (3-5) mérést végeztünk, és a műszer által megadott átlagértékkel számoltunk, ha a c.v. % nem volt több 5 %-nál. A bemérések alkalmával minden esetben kontrolláltuk az oldószer hatását. Standardizáltuk a térfogatot és azonos kísérleten belül azonos koncentráció-tartományokban hasonlítottuk össze a mintákat. A mintatérfogatok kutatási témánként eltérhettek. 50 és 250 µl térfogatokat pipettáztunk a mérőcsőbe. A kísérletek alkalmával csak luminol, H₂O₂-luminol, H₂O₂-hemin-luminol és H₂O₂-mikroperoxidáz-luminol reagenseket használtunk. Az „Eredmények” fejezetben minden alkalommal jelzem, hogy milyen rendszerben dolgoztam (Blázovics 1993, 1999a, 2000, 2002, Lugasi 1998).

3.10. Zsírsavösszetétel meghatározása

A májhomogenizátumok és epe zsírsavösszetételét gázkromatográfiás technikával határoztuk meg. A lángionizációs detektorral ellátott Hewlett-Packard gázkromatográfyon végzett elválasztás paramétereit a 3.10.1 és a 3.10.2. fejezetekben adom meg.

A májmintákból a lipidet 2:1 arányú kloroform-metanol eleggyel izoláltuk. A kloroformos fázis vízmentesítését és észterifikációját követően végeztük el az elválasztást (Horváth 1993).

Az epeminták zsírsavösszetételének meghatározása 500 µl epéből történt. A kloroform-metanol 2:1 arányú eleggyel izolált lipid fázis 1 cm³-es kloroformos aliquotjából dolgoztunk tovább. A lipideket 5 % NaOH-ot tartalmazó 50 %-os vizes metanolos-oldatban elszappanosítottuk, majd 10 %-os bór-trifluorid metanolos reagenssel észterifikáltuk. A hexánnal történő extrakció után a mintát szilikagélt tartalmazó oszlopon tisztítottuk tovább Alexander (1985) szerint.

3.10.1. Májminták vizsgálati körülményei

Mérési körülmények: Hewlett–Packard 5890 gázkromatográf

kolonna: SP2340 silica (60 m x 0,32 mm; 0,25 µm filmvastagság), hőmérséklet: kolonna:

180 °C, injektor: 220 °C, detektor: 220 °C, injektor: split split ratio 1:100, karriergáz: hidrogén 1,5 cm³/min, detektorgáz: hidrogén 30,0 cm³/min, levegő 400,0 cm³/min, nitrogén 30,0 cm³/min

3.10.2. Epeminták vizsgálati körülményei

Mérési körülmények: Hewlett –Packard 5890 gázkromatográf

kolonna: Carbowax 20M (25 m x 0,2 mm; 0,25 µm filmvastagság), hőmérséklet: kolonna:

180 °C, injektor: 280 °C, detektor: 205 °C, injektor: split split ratio 1:50, karriergáz: nitrogén 0,3 cm³/min, detektorgáz: hidrogén 30,0 cm³/min, levegő 400,0 cm³/min, nitrogén 30,0 cm³/min

3.11. Minták A- és E-vitamintartalmának meghatározása

Az A- és E-vitamintartalom szimultán meghatározását HPLC-módszerrel, GILSON MODULAR készülékkel, UV-115 típusú detektorral, BSP C18 kolonnán Rudy módszere szerint végeztük (1989).

3. 12. Szabad bilirubin és bilirubinszármazékok kimutatása epéből

A szabad bilirubint kloroformos extraktumból határoztuk meg Muraca módszerével (1983). A bilirubin és szabad bilirubin-származékok meghatározását HP 1090 folyadékkromatográfiás készülékkel és diodasoros detektorral határoztuk meg.

- kolonna: CHROSIL 10 µm, 250 x 4,6 mm; eluens: kloroform-etanol 99:1 + 0,5 % ecetsav; elválasztás: izokratikus; áramlás: 1 cm³/perc; detektálás: 440 nm; hőmérséklet: 40 °C - (Lásd a 4.3.2. fejezetet!)

3.13. Co⁶⁰ γ – besugárzás

A vizsgálatokhoz különbözőképpen kezelt állatcsoportok izolált májából készült mikroszóma preparátumok 5-10 mg/ml-es vizes szuszpenzióit in vitro 1,095 kGy/h dózisé

$\text{Co}^{60}\gamma$ –val sugaraztuk be 20 °C-on 40, 80 és 120 percig. A sugárforrás aktivitása 1750 TBq (MTA Izotópkutató Intézet).

3.14. ESR-vizsgálatok

Vegyületek szuperoxid-scavenger karakterét spin-trapping technikával tanulmányoztuk. A szuperoxidaniont hipoxantin-xantinoxidáz rendszerben gerjesztettük és DMPO (5,5'-dimetil-pirrolin-N-oxid) spincsapdát alkalmaztunk (Blázovics 199b).

Az ESR-spektrumfelvétel paraméterei JES-FE 2xG (JEOL Co. Ltd., Tokyo): mágneses mező térközép és mért tartomány: 355 ± 5 mT; modulációs frekvencia: 9,42 GHz; moduláció: 0,125 mT; amplitudó: 1000; lefutási idő: 0,3 sec; egy spektrum felvételének ideje: 2 min; mikrohullám erőssége: 8 mW

3.15. Anyagok

A silibinin injekciót és a silibinin-dihemiszukeinát szubsztanciát a MADAUS cégtől (Németország), az E-vitamint a HEK-Pharma-tól kaptuk ajándékba. A *Sempervivum tectorum* a Corvinus Egyetem (Kertészeti Egyetem) Botanikus kertjéből származott. A *Sempervivum tectorum* liofilizált extraktum (STF1) a Semmelweis Egyetem Gyógynövény- és Drogismereti Intézet munkatársai szabadalma alapján készült. SOTE Szabadalom, No: 207657/1993.

A Beiqishen tea kereskedelmi forgalomból származott (Daxing' anling Beiqishen Healthy Food Co, Ltd., Permission number No. 022; 1998) Forgalmazó: Egészséges Élet Kft. Engedélyek: OÉTI 50060/588061998; KERMI 99/2-00275. A Raphacol epegranulátum a Parma Patika terméke és ajándéka volt.

Vegyületek, enzimek, tápoldatok, pufferek, eszközök és származási helyük: DMPO, tetrametil-murexid, hidrogén-peroxid, luminol, mikroperoxidáz, hemin, DPPH, bilirubinstandard NADPH, NADH, telítetlen zsírsavstandard (SUPELCO FAME), E. coli 0111:B4 LPS és tripszin (SIGMA, USA), HPLC tisztaságú kloroform és etanol (MERCK, Németország) főtális borjúsavó (Phylaxia, Magyarország), HEPES-puffer (Serva, GFR), L-glutamine (Gibco, USA), lemezek (flat bottomed microplate) és műanyag csövek (Greiner, GFR), koncanavalin-A (Con-A), (Pharmacia, Svédország), ^3H -timidin (UVVR, Csehszlovákia), filterpapír (Dynatech, GFR), Millipore membrán USA, multiple cell harvester (Skatron Norvégia), TNF- α (NIBSC, Anglia), glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz, szérum bovin albumin (Calbiochem AG, Svájc) a felsorolt cégektől származtak.

A felhasznált reagensek, reagens-készletek és diagnosztikai készletek beszerzése magyarországi kirendeltségeken keresztül történtek: Dialab: Glucose GOD-PAP (D95218B), Cholesterol CHOD-PAP (D95116), Triglycerides GPO-PAP (D00389), Randox: Total protein (TP 9727),

Direct HDL-cholesterol (CH 2655), RANSEL (RS505), RANSOD (SD125), Uric Acid (UA 9730), HbA_{1c} (HA 34423), Roche: ALB plus (1970909), AST (IFCC) (11876848), ALT (IFCC) (11876805), GGT (liquid) (12016788), ALP opt. (11877348), α -Amylase liquid (11555693), Bil-T DPD (1489429), Byk-Diagnostica: LiaMat tumormarker AFP, CEA, CA19-9, Radelkis (Budapest): pH-oldatok, Diagnosticum Rt. (Budapest): IL-1 β -kit (103201) IL-6-kit (103101), epesavkit (45311), Biosource (USA): TNF- α .

A többi vegyszer a Reanalból származott (Budapest), illetve gyógyszertárban vásároltuk.

3.16. Statisztikai analízis

Microsoft Excel, STATGRAPH, Statisztika 5.0 és Statisztika 6.0 programokat, valamint a Gaph Pad version 1.14 software-t használtunk a mérések kiértékeléséhez. A kiértékelés varianciaanalízissel történt. Alkalmaztuk az Student-féle egy és kétmintás t-próbát és az ANOVA statisztikai programcsomagot. Lineáris regresszió és korrelációs koefficiens számolást, valamint Dixon-próbát végeztünk. A szignifikanciát 95 %-os valószínűségi szinten adtuk meg. Két független minta vizsgálatára, ha a normalitás vagy a varianciák homogenitása miatt a kétmintás t-teszt nem volt használható, a Mann-Whitney U-tesztet használtuk. Két változó kapcsolatának szorosságát nem normális eloszlás esetén a Spearman-féle rangkorrelációval vizsgáltuk (Dinya 2001). A kvantitatív vizsgálati eredményeket három párhuzamos mérés átlaga és szórása alapján $p < 0,05$ valószínűségi szinten értékeltük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Természetes eredetű hatóanyagok in vitro tanulmányozása

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) felmérései szerint a Föld népességének mintegy kétharmada elsődlegesen gyógynövényeket használ orvosságként. Még a kritikus vélemények is elismerik, hogy a harmadik világ egészségügyi védelmében kiemelkedően fontos szerepet töltenek be a gyógynövények (Hagymási 1999).

Az 1989-ben Németországban megalakult ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy), melynek Magyarország is tagja, azt a célt tűzte ki feladatául, hogy az Európai Gazdasági Szövetség (ma Európai Unió) irányelvei alapján biztosítsa a fitofarmakonok legteljesebb megfeleltetését a gyógyszerekkel szemben támasztott követelményeknek, és meghatározza a fitoterápia helyét a gyógyításban (Kéry 1995). Az alapító és társult tagok célja a kísérletes- és klinikai kutatások finanszírozása, a fitogyógyszerek elismertetése az orvosi gyakorlatban, a fitoterápiás tudományos hálózat kialakítása és a nemzetközi információcsere. Hazánkban a fitoterápia alkalmazása az utóbbi években egyre nagyobb jelentőséggel bír a háziorvosi és kórházi gyakorlatban.

A természetes növényi kivonatok (tea, extraktum, tinktúra, juice stb.) hatásának vizsgálata a természettudományok különösen fontos területévé vált, mert számos vegyület úgynevezett "aktív komponens" gyógyhatással rendelkezik (Ameer 1996, Arai 2000, Blázovics 2000, 2002, Bravo 1998, Cook 1996, Herrman 1988, Hertog 1998, Huang 1992, Kellis 1984.). A gyógyhatású termékek minden egyes hatóanyagának izolálása és szerkezetének, funkciójának meghatározása azonban rendkívül bonyolult, és csaknem lehetetlen vállalkozás, ezért általánosan elfogadott, hogy magát a gyógyhatású készítményt vizsgálják hatástani szempontból.

A magasabb rendű növények számos faja szabadgyök-fogó, antioxidáns és gyulladáscsökkentő vegyületeket szintetizál életműködése során. Jelenlegi ismereteink szerint a gyógyhatású növények mindegyikében megtalálhatók a scavenger típusú flavonoidok és polifenolok (Larson 1988, Kéry 1995, Tarr 2002)

4.1.1. *Sempervivum tectorum*

A *Sempervivum tectorum* L, (*Crassulaceae*) évszázadok óta ismert gyógyhatású növény. Népies nevén házi vagy rózsás fülfű, fülbecsavarintó, fülbeeresztő fű, házizöld, Jupiter szakáll, kőrózsa, kövirózsa, (Penso 1982). Pozsgás leveleit már a középkorban is fogyasztották. Egyes mediterrán országokban a leveleket salátához adják, de készítenek belőle bőrtápláló krémet, vagy fürdővízbe teszik. A friss levelekkel torokgyulladást, szájpenészt, légcsőhurutot kezelnek (Bremnes 1994). Hazánkban fülcseppként ismert, de kisebb égési sérülések, csípések kezelésére is használják.

A *Sempervivum tectorum* liofilizált kivonata (STF1) oligomer és polimer polifenolokat, fenolkarboxilsavakat, aszkorbinsavat, flavon- és flavonol-mono-és diglikozidokat, kempferol és

kvercetin aglikonokat, tanninokat, kumarinokat, oligo- és poliszacharidokat tartalmaz. A rutin analitikai vizsgálatok szerint poliszacharid-tartalma 11,2 % (nyákanyag), mely hidrolízis hatására ramnóz, arabinóz, xilóz, mannóz, galaktóz egyszerű cukrokra és uronsavra bomlik. Polifenoltartalma 4,2 %, fő komponensei a kondenzált proantocianidinek. Flavon- és flavonol-glikozid 0,7 %-ban van jelen a liofilizátumban, HPLC-vel történő szétválasztás és diodasoros detektálás eredményeképpen 20 különböző flavonol és flavonol- mono-, ill. diglikozid különíthető el (Kéry 1992, Blázovics 2000).

A toxikológiai vizsgálatok alapján az LD₅₀ érték ip. 2276 mg/kg hím állatokban, nőstényekben az LD₅₀ érték 2098 mg/kg. A maximális tolerálhatóság dózisa ip. 500 mg/kg, per os 5000 mg/kg. A liofilizátum alkaloidokat nem tartalmaz (Blázovics 2000).

Célkitűzés

Kutatásunk célja az volt, hogy a STF1 antioxidáns, gyökfogó, redukáló, illetve protondonor képességét meghatározzuk. A gyökfogó tulajdonság igazolására luminometriás módszert fejlesszünk ki MEDICOR-MEDILAB készülékre. Határozzuk meg a liofilizátum fémion-összetételét, amely jelentősen befolyásolhatja a polifenolos vegyületek felszívódását és biológiai hasznosulását.

Kísérleti körülmények

A gyökfogó tulajdonság bizonyítására luminometriás és ESR-módszereket alkalmaztunk. A luminometriás vizsgálatokat MEDICOR-MEDILAB készüléken végeztük. A mérési eredményeket mV-ban adtuk meg (Blázovics 1993b). Az ESR-vizsgálatok Tokyoban készültek (Prónai 1993). A H-donor-aktivitást Blois (1958) módszerének kis módosítása (Lugasi 1998) alapján 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil stabil gyök jelenlétében mértük 517 nm-en spektrofotometriásan.

A redukálóképességet Oyaizu (1986) szerint 700 nm-en határoztuk meg. A komplexképző aktivitást a 3.9.1.6. pontban leírtaknak megfelelően vizsgáltuk Shimada és mtsai szerint (1992).

A lipidperoxidáció vizsgálatát patkánymáj-homogenizátumon végeztük. A nem enzimatikusan kiváltott lipidperoxidációt Player (1981), és az enzimatikusan kiváltott lipidperoxidációt Jordan (1982) szerint határoztuk meg. A malondialdehid-koncentrációjának meghatározását Ottolenghi (1959) szerint tiobarbitursavas reakcióval végeztük. A moláris abszorpciós együttható: A₅₃₂ 156 mM⁻¹cm⁻¹. Az elemösszetételt ICP-OES technikával határoztuk meg (Szentmihályi 1999, Blázovics 2002).

Eredmények

Az in vitro luminometriás vizsgálatok igazolták, hogy a STF1 direkt gyökfogó tulajdonsággal rendelkezik, mert gátolja a H₂O₂/OH⁻ - hemin - luminol rendszerben a luminol → aminoftalát átalakulást, azaz befogja a rendszerben képződő szabad gyököket (Blázovics 1993b). A

rendszerben keletkező fény intenzitásának csökkenése a vizes kivonat koncentrációjának függvényében változik. A 2. táblázatban a STF1 koncentrációfüggő gyökfogó tulajdonságát mutatom be. A STF1 koncentrációtól függően képes a luminolt gerjeszteni H_2O_2 távollétében is, ugyanakkor gyökfogó képessége igazolható a $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}$ -luminol rendszerben. A luminol-reagens 0,7 mM luminolt, 3,8 μM hemint és 11,8 mM Na_2CO_3 -ot tartalmazott, a pH 11 volt.

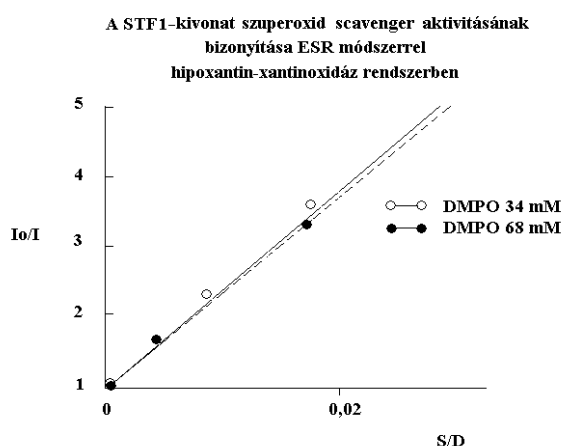
2. táblázat

<i>Sempervivum tectorum</i> -kivonat hatása a $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}$ - hemin - luminol rendszerre kemilumineszcenciás intenzitás ($\text{mV} \times 3\text{min}$)		
STF1 (mg/ml)	H_2O_2 hiányában (átlag $\pm$ szórás)	H_2O_2 3,83 $\times 10^{-6}$ M (átlag $\pm$ szórás)
0,0	0,000	3009666 $\pm$ 135337
4,34 $\times 10^{-1}$ M	271000 $\pm$ 9450	105516 $\pm$ 7052
4,34 $\times 10^{-2}$ M	189700 $\pm$ 6700	292000 $\pm$ 24535
4,34 $\times 10^{-3}$ M	105000 $\pm$ 6100	1234000 $\pm$ 149829
4,34 $\times 10^{-4}$ M	70710 $\pm$ 5040	1759500 $\pm$ 178898
4,34 $\times 10^{-5}$ M	37110 $\pm$ 2100	1776383 $\pm$ 96707

A STF1 antioxidáns molekulái mellett fémiontartalma is befolyásolja a luminol $\rightarrow$ aminosftalát átalakulást (Szentmihályi 2000c).

ESR-vizsgálatokkal a *Sempervivum tectorum*-kivonat szuperoxid-scavenger karakterét tanulmányoztuk spin-trapping technikával (23. ábra).

23. ábra



Az ESR-spektrumokat JES-FE 2xG (JEOL Co. Ltd., Tokyo) készülékben vettük fel. A szuperoxidaniont hipoxantin-xantinoxidáz rendszerben gerjesztettük és DMPO (5,5'-dimetil-pirrolin-N-oxid) spincsapdát alkalmaztunk (Blázovics 1993b, Prónai 1993).

A 3. táblázatból kiderül, hogy a STF1 nem gátolja a szabad gyököt generáló xantinoxidáz enzimet.

3. táblázat

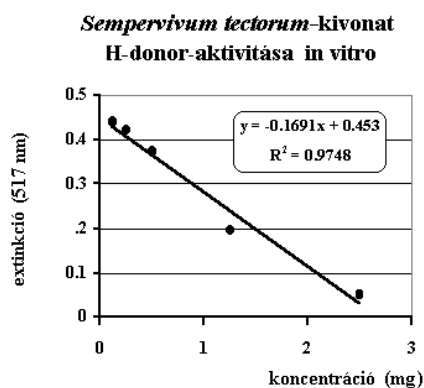
A STF1 gyökfogó aktivitásának meghatározása ESR-módszerrel		
minták	50 %-os gátlás (I_{50})	direkt hatás a HT/XO rendszerre
DMPO	34,0 mM 68 mM	nincs gátlás
STF1	0,25 mg 0,50 mg	

HT/XO = hipoxantin-xantionoxidáz

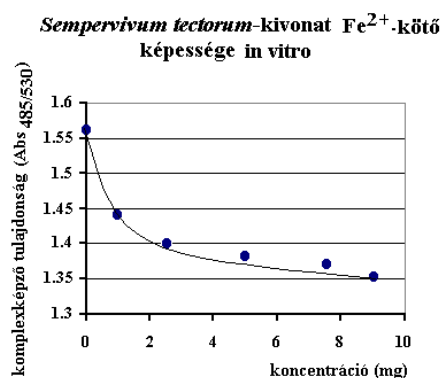
Az ESR-spektrumfelvétel paraméterei JES-FE 2xG (JEOL Co. Ltd., Tokyo): mágneses mező térközép és mért tartomány: 355 ± 5 mT; modulációs frekvencia: 9,42 GHz; moduláció: 0,125 mT; amplitudó: 1000; lefutási idő: 0,3 sec; egy spektrum felvételének ideje: 2 min; mikrohullám erőssége: 8 mW

A *Sempervivum tectorum* liofilizátumból készült vizes oldat képes volt a stabil DPPH gyököt regenerálni, amely hatás koncentrációfüggő volt. Az eredmény a 24. ábrán látható. A STF1-minta koncentrációtól függően a Fe^{3+} -mat Fe^{2+} -vé redukálta (25. ábra). A minta mind a Fe, mind a Cu ionokkal komplexet képzett (26., 27. ábra). A STF1 kedvező tulajdonságai alapján várható volt, hogy a szöveti preparátumokon kiváltott lipidperoxidációs folyamatokat is mérsékelni lehet.

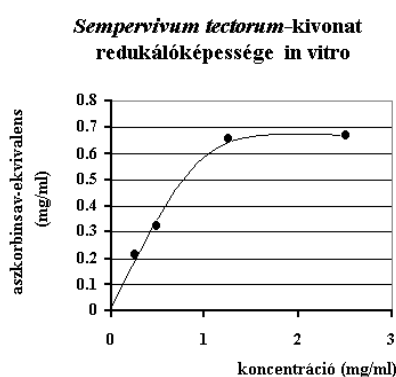
24. ábra



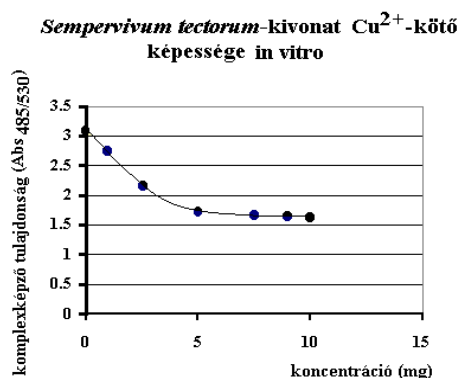
26. ábra



25. ábra



27. ábra



A STF1 in vitro gátolta mind az aszkorbinsavval nem enzimatis úton, mind a NADPH-val enzimatis úton kiváltott lipidperoxidációt is patkánymáj-mikroszóma-preparátumon. (Blázovics 1993, 1993a, 1994a). (Lásd még a 4.2.1.1. fejezetben!)

A *Sempervivum tectorum* drog és liofilizátum elemösszetételét a 4. táblázat tartalmazza.

A kapott eredmények az irodalom szerint relatíve nagy a Ca- és Mg-koncentrációt mutatnak (Kabata-Pendias, 1992). A kimutatási határnál nem volt nagyobb a toxikus elemek koncentrációja

(As, Cd, Hg, Pb) és hasonlóan kis koncentrációban fordult elő Co, Cr, Mo, V is, ezért ezek az elemek nem szerepelnek a táblázatban. A kivonat K/Na aránya miatt enyhe diureticus hatás jelentkezik (Szentmihályi 2000a,b Blázovics 2002).

4. táblázat

A <i>Sempervivum tectorum</i> növény és liofilizált kivonat elemösszetétele ($\mu\text{g/g}$, n=3)		
elemek	növény ($\text{átlag} \pm \text{szórás}$)	liofilizátum ($\text{átlag} \pm \text{szórás}$)
Al	108,2 $\pm$ 2,1	797,5 $\pm$ 18,1
B	3,27 $\pm$ 0,16	43,38 $\pm$ 0,67
Ba	22,27 $\pm$ 0,25	21,64 $\pm$ 0,26
Ca	51296 $\pm$ 764	54779 $\pm$ 428
Cu	3,71 $\pm$ 0,20	9,13 $\pm$ 0,02
Fe	65,62 $\pm$ 1,22	31,39 $\pm$ 0,29
K	23151 $\pm$ 172	45183 $\pm$ 188
Mg	7274 $\pm$ 86	14626 $\pm$ 176
Mn	51,58 $\pm$ 0,46	152,7 $\pm$ 1,4
Na	66,06 $\pm$ 5,07	341,4 $\pm$ 38,5
P	3941 $\pm$ 63	3424 $\pm$ 51
S	2839 $\pm$ 36	6136 $\pm$ 59
Zn	26,48 $\pm$ 0,24	65,66 $\pm$ 0,70

5. táblázat

Napi bevitel számítása 2g/ttkg kezelés mellett (130 g-os patkány és 70 kg súlyú ember esetében)		
elemek	patkány (μg)	ember (mg)
Al	207,4	111,6
B	11,3	6,1
Ba	5,6	3,03
Ca	14242	7669
Cu	2,37	1,28
Fe	8,16	4,39
K	11747	6326
Mg	803	2048
Mn	39,69	21,37
Na	88,77	47,80
P	890,4	479,5
S	1595	859
Zn	17,07	9,19

Az 5. táblázat a számított napi elembevitt tartalmazza a feltüntetett dózis mellett. Néhány elem esetében a megadott dózis (állatkísérletekben alkalmazott dózis) relatíve nagy a Recommended Dietary Allowances (RDA, 1989) szerint. A Ca, K, Mg és Mn úgy tűnik, hogy terápiás hatást fejt ki, mivel a Ca (RDA 800 mg/nap /felnőtt/) és a Mn (RDA 2-5 mg/nap /felnőtt/) 10x, a Mg (RDA

350 mg/nap /felnőtt/) 6x nagyobb mennyiséget jelent. A kivonat jó Cu- (RDA 1,5-3,0 mg/nap /felnőtt/) és Zn-forrásnak (RDA 15 mg/nap /felnőtt/) számít.

Következtetések

A *Sempervivum tectorum* liofilizált készítmény jelentős mennyiségben tartalmaz polifenolos vegyületeket, melynek következtében szuperoxidanion és hidrogén-peroxid/hidroxil gyökfogó. Kíváló protondonor és komplexképző tulajdonságokkal rendelkezik. Antioxidáns tulajdonságának köszönhetően képes gátolni az aszkorbinsavval nem enzimatikusan és NADPH + Fe³⁺-mal enzimátikus úton kiváltott lipidperoxidációt is patkánymájmikroszóma-preparátumon. A gyógyhatású készítmények elemtartalma kiegészítheti a napi elemszükségletet. A Ca, K, Mg és Mn esetében terápiás célokra is felhasználható, de a Cu- és Zn-tartalom is kedvező tulajdonságot kölcsönöz a liofilizátumnak (Blázovics 2002).

4.1.2. Beiqishen tea

Kínában az évszázadok alatt egyre bővülő, és felülbírált, módosított gyógynövénykészítmény leíratok gyűjteménye körülbelül 500 általánosan használt receptet tartalmaz, amelyből minden esetben gondosan kiválasztják a beteg egyedi sajátságainak figyelembe vételével a legmegfelelőbb készítményt, és azt az egyénre „igazítják”, vagyis bizonyos komponenseket elhagynak, vagy azok dózisát változtatják. Leginkább főzeteket alkalmaznak könnyű elkészíthetőségük miatt. Az európai orvoslás számára sok esetben nehezen értelmezhető fogalmak társulnak a készítmények hatásmechanizmusának leírásához. A kínai nyelv nem ismerése, a téves, más nyelvből történő áttétes fordítások gyakran vezetnek súlyos félreértésekhez. Ezért nemcsak a készítményt, hanem annak felhasználását is külön meg kell vizsgálni (Rapavi 2000, 2000a).

Magyarországon a teakúrákkal kapcsolatban az tapasztalható, hogy egyáltalán nem veszik figyelembe a betegek közötti fiziológiás eltéréseket. Ennek egyik oka az, hogy nem ismert a hatóanyagok esetlegesen eltérő biológiai hasznosulása a genetikai polimorfizmus miatt. Az is gondot okoz, hogy nem figyelnek az egyes komponensek esetleg kiugróan magas dózisára sem. Ez különösen akkor válik jelentőssé, ha a fogyasztás kontrollálatlan (Jadoul 1993, Vanherweghem 1993, Buth 1993, Gartner, 1993).

A Magyarországon forgalmazott Beiqishen tea (Daxing' anling Beiqishen Healthy Food Co, Ltd.) komponenseinek összetételére vonatkozó angol-, illetve magyarnyelvű ismertető számos pontatlanságot tartalmazott, ezért Internet-kutatást végeztünk, és a <http://www.beiqishen.com/> alatt talált leírást összehasonlítottuk az általunk vásárolt készítmény leírásával.

Az Interneten közzétett adatok szerint készítményünknek az *Astragalus membranaceus* gyökerét, szárát, a *Ganoderma lucidum* (mushroom) egészét, a *Lycium species* (Chinese wolfberry) gyümölcsét és a *Camellia sinensis* levelét kellene tartalmaznia (Héthelyi 2001).

Az *Astragalus*-nak több mint 2000 típusa ismert világszerte, melynek egyik képviselője az *Astragalus mongolicus*, (syn. *A. membranaceus*). A növény Kína északi részén, Yunnan és Sichuan területein őshonos. „Huang qi” a *Leguminosae* család tagja. Shen Nung, aki a kínai herbák gyógyászati célra való felhasználását megalapozta, az *Astragalust*, mint „vezető” növényt osztályozta a „Shen Nung Pen Tsao Ching” című értekezésében (a.D.100). A növény kínai neve a Huang qi lefordítva „yellow leader”, azaz „sárga vezető”. A név utal a gyökér sárga színére és a gyógyításban betöltött vezető szerepére. A növény gyökérzete a drog. Főbb hatóanyagai: glikozidok, poliszacharidok, kolin, betain, rumatakenin, β -szitoszterol, flavonoidok, triterpénglikozidok (astragalosides I-VII) aminosavak és nyomelemek (Shu 1986, Foster 1992, Leung 1996, Shen 1987).

Az *Astragalus* növényből készült gyógyhatású készítmények immunmoduláns hatása közismert. Alkalmazzák Alzheimer-kórban, kemoterápiás kezelés után, fertőzések és megfázás, torokfájás ellenszeréül. A drog káros mellékhatása nem ismert.

A *Lycium barbarum* vagy kínai farkasbogyó, a *Solanaceae* (burgonyafélék) családba tartozik, amely Kínában mind gyógy-, mind élelmezési növényként is alkalmazható. Termése, a hosszúkás, skarlátvörös, sok magvú bogyó, a drog. Már a Tang dinasztia (i.e. 1000-1400,) idején is ismert volt. Számos betegségben alkalmazták. A piros színű bogyó kellemes ízű, hatóanyagai a poliszacharidok, β -karotin, C-vitamin, fehérje és 21-féle nyomelem. Napjainkban is kutatják hatóanyagainak kémiai jellegét, hatását és alkalmazhatóságát. Szembetegségekben, máj- és vesekárosodásban, tüdővizényőben alkalmazzák. Kiváló vérnyomás- és vércukorszint-csökkentő hatása van, ezért hypertóniában és diabetesben sikerrel alkalmazható. Hazánkban is ismert, élőlő cserje a *Lycium barbarum* (ördögcérna). A nálunk honos növény minden szerve kis mennyiségben tartalmaz hallucinogén hatású anyagot, hioszciamint és más atropin jellegű alkaloidot. A megbetegedés tünetei: pupillatágulat, nyálkahártya kiszáradása, szapora szív működés, izgatottság, ritkábban légzésbénulásos halál. Ezért Magyarországon, mint mérgező növényt tarják nyilván (Haraszi 1985, Héthelyi 2001, Molnár 2002).

A *Ganoderma lucidum* (Ling zhi) gomba kedvező hatásait a kínai népgyógyászatban 4000 éve ismerik és alkalmazzák. Neve, a „Ling zhi” azt jelenti, a halhatatlanság növénye. A *Ganoderma lucidum* termőtestéből tumorgátló, immunstimuláns poli- β -D-glukánt izoláltak (Mizuno 1985). Hänsel (1984) és Wagner (1985) szerint a növényi immunstimulánsok „specifikusan” fokozzák a szervezet immunmechanizmusát. A vízben oldódó glukán típusú poliglukánokra jellemzőek az 1–3, illetve 1–6 C-C kötésű, β - állású D-glukánok. Ezeknek a vegyületeknek a molekulatömege

20-500 ezer, de akár milliós nagyságrendű is lehet (Mizuno 1984, 1985). A *Ganoderma lucidum*ot alkalmazzák krónikus sárgaságban, vesegyulladásban, hypertóniában, bronchitisben és asthmában. Lipidszintcsökkentő hatásuk igazolt (Szabó 1987).

A Beiqishen teát kereskedelmi forgalomból szereztük be. Az ismertetőben az *Astragalus mongolicus* (Danxing' anling) gyökere, lágy szára, levele és virága, Glossy Ganoderma és a Chinese wolfberry gyümölcse, valamint "tea" volt feltüntetve. Az ajánlott dózis: alkalmanként 1 csomag filtertea naponta 3 alkalommal 5 perces áztatási idővel. A fogyaszthatóságra vonatkozóan korlátozó megjegyzés nem szerepelt. A készítményt "panacea"-ként ajánlották.

Mivel mi a Beiqisen teából nem tudtunk kimutatni alkaloidokat, ezért e vegyületek toxikus hatásával nem foglalkoztunk (Blázovics 2003b, 2004b). A „tea” valószínűsíthetően *Camellia sinensis*.

Célkitűzés

A Beiqishen tea részleges fitokémiai analízisével az volt a célunk, hogy a pontatlan angol, illetve magyar fordítás miatt megkérdőjelezhető összetételt ellenőrizzük. A redukálóképesség, protondonor-, komplexképző- és gyökfogó-tulajdonságok meghatározásával pedig a tea antioxidáns tulajdonságát kívántuk ellenőrizni, illetve összehasonlítani más ismert teakészítményekkel.

Kísérleti körülmények

A Beiqishen tea drogjainak (különböző dobozokból származó 10-10 filtertea homogenizátumából készült minta), illetve a teakeverékből készült vizes kivonat (2g homogenizátum/250 ml forró bidesztillált víz, 30 perces áztatási idő) polifenol, flavonoid és tannintartalmát a „Módszerek és anyagok” fejezet 3.9.1.1., 3.9.1.2., 3.9.1.3. pontjaiban leírtak alapján határoztuk meg. A polifenolok meghatározását a Magyar Gyógyszerkönyv (VII. Kiadás, 1992) módszerével végeztük spektrofotometriásan 750 nm-en, pirogallol standard mellett. A flavonoidtartalmat, a glikozidokat és az aglikonokat együttesen aglikon formában a German Pharmacopoeia (Deutsche Arzneibuch, DAB10, 1996) szerint határoztuk meg. A tanninokat a Magyar Gyógyszerkönyv (VII. Kiadás, 1992) szerint mértük standard bőrpúder segítségével. Az antioxidáns tulajdonságot a 3.9.1.4., 3.9.1.5. és 3.9.1.6. pontok alatt ismertetett módszerekkel vizsgáltuk. A TAS (total antioxidant status) meghatározása Randox diagnosztikus kittel történt COBAS MIRA automata laboratóriumi analizátorral. A 3.9.3. pontban leírt, saját fejlesztésű luminometriás módszerrel határoztuk meg a teakivonat gyökfogó kapacitását Berthold Lumat 9501 készülékkel. A fenolos komponensek vizsgálata vékonyréteg-kromatográfiával történt a 3.9.2.1. pont szerint. Az aromás komponenseket gázkromatográfiával határoztuk meg (3.9.2.2.), és a GC/MS tömegspektrográfias vizsgálatokat a 3.9.2.3. pontban ismertettük (Héthelyi 2001,

Blázovics 2003b, 2004b). Az esszenciális és illóolajok azonosításához a NIST könyvtár használtuk (Finnigan Corp. San Jose, CA).

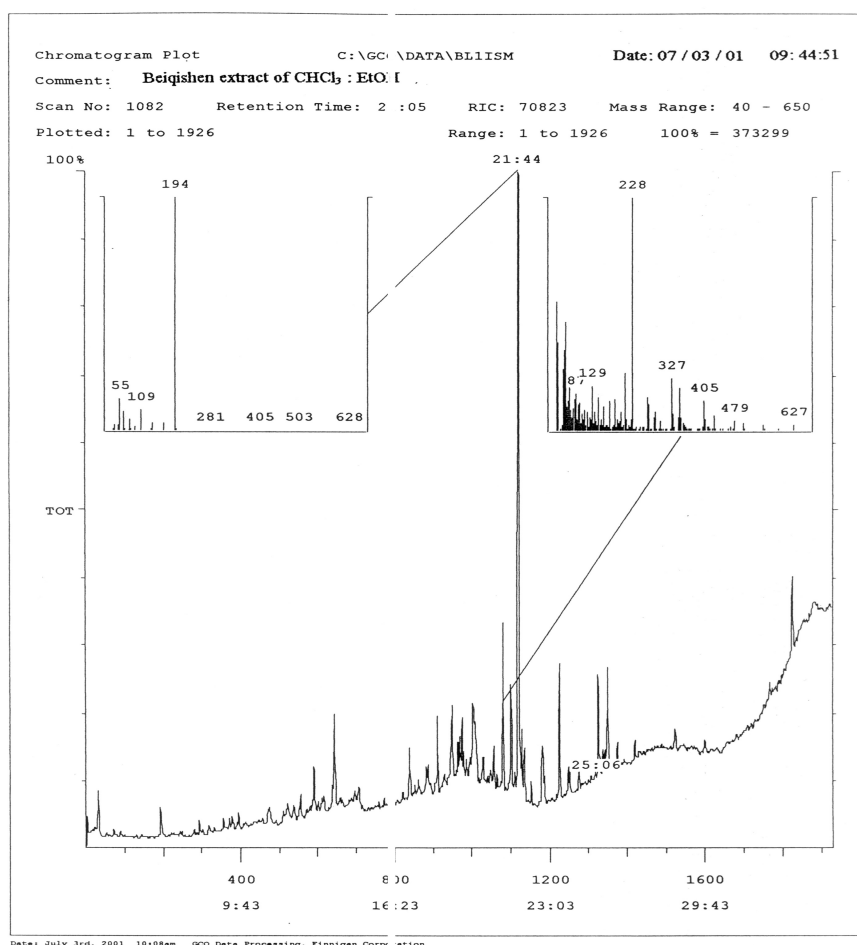
Eredmények

A Beiqishen filtertea drogjainak polifenoltartalma $20,77 \pm 0,52$ g/100g drog, tannintartalma $9,063 \pm 0,783$ g/100g drog és flavonoidtartalma $0,485 \pm 0,036$ g/100g drog. Ezek a komponensek biztosítják a tea jelentős antioxidáns kapacitását. A fitokémiai vizsgálatok szerint a Beiqishen tea főzet (2g/250ml) polifenolkoncentrációja 83,2 mg/100ml, kempferolkoncentrációja 1,99 mg/100ml és kvercetinkoncentrációja 0,75 mg/100ml volt.

Vizsgálataink szerint a készítmény frissítő hatása dominánsan a koffeintartalomnak köszönhető.

A Beiqishen teakivonat GC-kromatogramja nagy mennyiségben jelenlévő (30-36 %) komponenst mutatott $\lambda=272$ nm abszorpciós maximummal. Az MS vizsgálat a NIST könyvtár alapján koffeint azonosított (molekulasúly: 194, retenciós idő: 21 min). A koffeinkoncentráció a teakeverékben 1,08 mg/100g. A kioldódás a főzetben 75,1 %-os volt. A 28. ábrán a Beiqishen tea kloroformos kivonatának TIC kromatogramja, a koffein tömegspektruma látható.

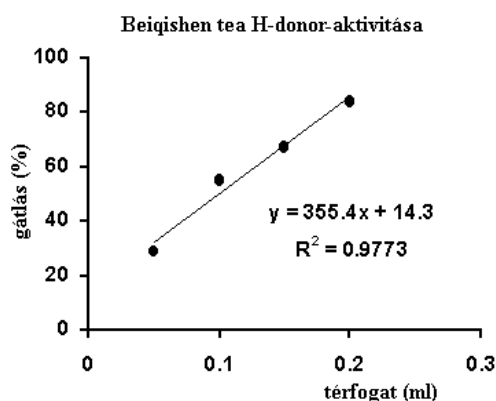
28. ábra



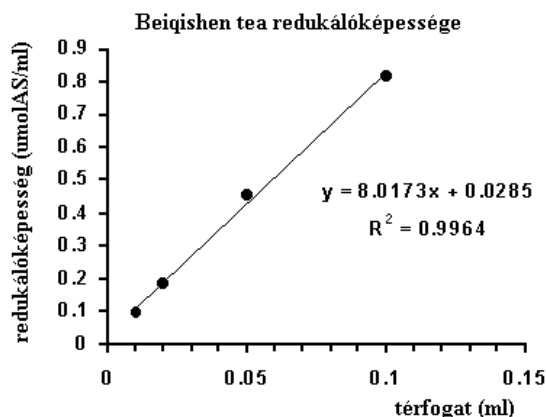
A Beiqishen tea protondonor-képességét DPPH stabil gyök jelenlétében mértük, és gátlás %-ban adtuk meg. Meghatároztuk a minta 50 %-os gátlását, mely szerint: $I_{50} = 0,10$ ml teaextratum. A DPPH színikifejlődésének 50 %-os gátlását aszkorbinsav esetében $I_{50} = 0,013$ mg-nak és trolox esetében $I_{50} = 0,018$ mg-nak találtuk.

A 29. és 30. ábrakon a tea-főzet koncentrációfüggő H-donor-aktivitását és redukálóképességét tüntettem fel.

29. ábra



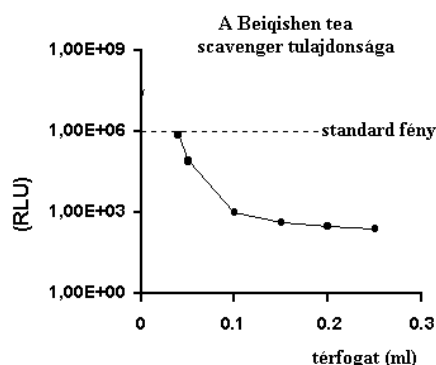
30. ábra



A teaminta redukálóképességét a Fe(III)/Fe(II) redoxireakcióval mértük. A redukálóképességet aszkorbinsav-ekvivalensben fejeztük ki (ASE/ml). ASE/ml = 1 ml minta redukálóképessége 7,78 μ mol aszkorbinsav koncentrációval egyenértékű. A „total antioxidant status” 8,7 mmol/trolox-ekvivalens volt, amely jól korrelált a kemilumineszcenciás mérések értékével.

Kemiluminometriás módszer segítségével H_2O_2 /OH-mikroperoxidáz-luminol rendszerben a tea erős gyökfogó kapacitását mértünk ($\approx 99\%$ 0,1 ml térfogat) (31. ábra).

31. ábra



A tea drogjainak illóolaj komponenseit a 6. táblázat tartalmazza. A 32. ábra a gázkromatográfias vizsgálat eredményét mutatja.

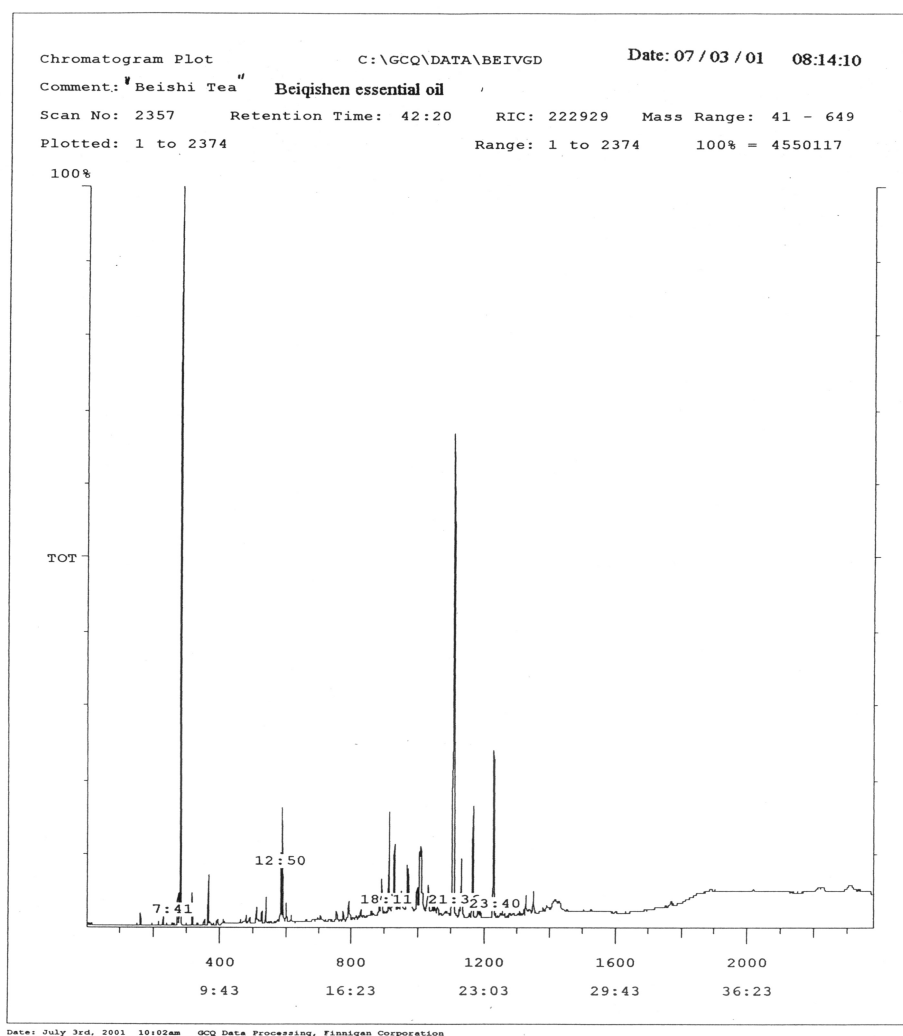
6. táblázat

A Beiqishen tea jellegzetes illóolaj komponensei				
t_R min.	GC %	Ms	képlet	komponens
4,50	21,0	136	C ₁₀ H ₁₆	(+) limonén
7,38	1,4	136	C ₁₀ H ₁₆	β -ocimen
12,69	1,7	134	C ₁₀ H ₁₄	p-cimen
16,75	3,2	148	C ₁₀ H ₁₂ O	esztragnol
17,15	2,6	150	C ₁₀ H ₁₄ O	timol
17,42	1,1	150	C ₁₀ H ₁₄ O	karvakrol
17,71	3,5	164	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	eugenol
20,37	10,0	248	ismeretlen	ismeretlen
21,95	16,0	264	ismeretlen	ismeretlen
24,10	9,5	278	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	dibutil- ftalát

(t_R = retenciós idő; Ms = molekulaszám; GC % = %-os arány)

A 32. ábrán a Beiqishen tea vízgőzdesztillációval nyert illóolajának GC/MS TIC kromatogramja látható.

32. ábra



Az alábbi táblázatokban néhány teára vonatkozó TAS-értéket (7. táblázat) és komplexképző aktivitásértéket (8. táblázat) adtam meg.

7. táblázat

TAS értékek teákban				
	teakészítés	TAS (mmol/l)		
név	x g → 20 ml, 80°C-on 10 percig	1.	2.	átlag
Körömvirág tea	0,2096	1,25	1,20	1,22
Májvédő tea	0,2108	1,35	1,40	1,38
Beiqishen tea	0,2242	7,05	6,90	6,98
Hibiszkusz tea	0,2037	2,00	2,15	2,08
Tisztító tea	0,2072	2,45	2,45	2,45
Salaktalanító tea	0,2057	3,40	3,35	3,38
Gyomorte	0,2172	10,00	10,00	10,00
Zöldtea	0,2095	14,90	15,30	15,10

8. táblázat

Komplexképzés teákból				
	kontroll	komplexképzés (A_{485}/A_{530})		
név		0,2 ml minta	0,5 ml minta	1,0 ml minta
Körömvirág tea		2,82	2,15	1,71
Májvédő tea		2,88	2,37	1,95
Beiqishen tea		2,63	2,21	1,86
Hibiszkusz tea	$3,50 \pm 0,03$	2,66	2,14	1,71
Tisztító tea		2,80	2,39	1,96
Salaktalanító tea		2,81	2,34	1,94
Gyomorte		2,44	2,02	1,85
Zöldtea		2,29	1,85	1,68

Következtetések

A gyógynövényekkel kapcsolatos kuruzslásszintű gyógymódok helyett tudományos igényű drogismereten, és egyre mélyebb hatástani elemzések alapján kell értékelni és újraértékelni a sokszor több ezer éves tapasztalatokat.

A komponensek között szinergista és antagonist hatások feltételezhetők. Számos polifenol, különösen a tanninok dózisfüggően kicsapják a fehérjéket, így penetrációjuk a mucous membránon nem valósul meg, illetve a membránkárosodás mértékétől függően gyulladásos folyamatokat generálnak (Lugasi, 2000, Sakagami 2000).

A természetes eredetű készítmények önmagukban is toxikusak lehetnek, azonban még nagyobb veszélyt jelenthet gyógyszerekkel történő interakciójuk, illetve a gyógyszerek felszívódását befolyásoló hatásuk. A koffein az apoptózis hatásos inhibitora, hatása ellentétes a fenolos antioxidásokéval. A Beiqishen tea főzet jelentős polifenol-, cserzőanyag-, illetve koffeintartalma miatt a hosszantartó kúrák alatt, vagy nagyobb mennyiségben történő fogyasztáskor egészségkárosító lehet. A készítmény illóolajtartalma minimális.

4.2. Antioxidáns terápia jelentősége a redox-homeosztázis változására állatkísérletes modellekben

A szabadgyökös reakciók tanulmányozása in vitro és in vivo körülmények között direkt és indirekt módszerekkel történhet, mely módszerek megválasztását mindig az adott kutatási feladat határozza meg. A kutatások során jól alkalmazhatók az úgynevezett „fingerprint” technikák, melyek a szabadgyökös reakciók hatására károsodott molekulák vizsgálatát, enzimaktivitás-változások mérését, szöveti nekrozisok morfológiai tanulmányozását, vagy az immunrendszerben beálló változások elemzését jelenti. A legnagyobb problémát az in vitro és in vivo kísérletek közötti kapcsolatok feltárása okozza.

Számos molekula kémiai szerkezete alapján kiváló gyökfogó, antioxidáns tulajdonságú, de élettani hatása kedvezőtlen, vagy toxikus. Még mindig nagyon keveset tudunk az antioxidáns karakter mellett fellépő egyéb élettani hatásokról, amely fokozottan jelentkezik többkomponensű gyógyhatású készítmények esetében. Ezért az analitikai tisztaságú vegyületek, illetve a többkomponensű termékek esetében az in vivo antioxidáns tulajdonság tesztelésére kidolgozott módszerek kapcsán nem elégedhetünk meg egy-egy kiragadott paraméter változásának meghatározásával, hanem törekednünk kell széleskörű kutatásra. Az in vivo patobiokémiai tanulmányokhoz elsődleges fontosságú a vizsgált betegség állatkísérletes modelljének kifejlesztése, ellenőrzése és a vizsgált betegségekre jellemző markerek meghatározása. Az antioxidáns terápia hatásosságának vizsgálatakor bizonyítanunk kell, hogy a funkciózavarokat valóban szabadgyökös reakciók okozták, vagy annak kialakulásában döntő jelentőségük volt. Bizonyítanunk kell, hogy a vizsgált hatóanyag ténylegesen a szabadgyökös reakciókat gátolta a láncreakciók valamelyik fázisában, és nem egyéb kölcsönhatást, biokémiai változást mérünk. Nagyon fontos a dózis/hatás összefüggés elemzése.

4.2.1. Antioxidánsok hatása alimentáris eredetű zsírmájban

A patológiás szabadgyök-reakciók kétségtelenül szerepet játszanak számos betegségben. Epidemiológiai vizsgálatok igazolták, hogy e megbetegedések nagymértékben függnak a táplálkozási szokásoktól és a tradícióktól. Az egészségtelen táplálkozási szokások, az alkohol és a lipidekben gazdag diéta többek között a gastrointestinalis tractus gyulladásos megbetegedéseire, májkárosodásokhoz vagy epeköbetegségekhez vezetnek. E betegségek megelőzhetők, illetve mérsékelhetők dominánsan növényi eredetű táplálkozással, és absztinenciával.

A helytelen táplálkozást zsírdús táp etetésével, illetve zsírdús táp és alkohol együttes adásával modelleztük patkányokban. Ez az „alimentáris hyperlipidaemia” modell alkalmas volt arra, hogy

tisztázzuk a szabadgyökös reakciók jelenlétét a következményesen kialakuló zsírmájban, másrészt kiváló lehetőséget biztosított a feltételezetten májvédő, cholereticus, cholekineticus készítmények antioxidáns, membránstabilizáló, lipidmetabolizmust befolyásoló és immunstimuláns hatásának tanulmányozására (Blázovics 1992, 1993, 1993a, 1994, 1995, 1995a, 1996b, 1997, 2000, 2002, Horváth 1993, Fehér 1998, Kocsis 2002, 2004a).

Az értekezés terjedelmére való tekintettel a 4.2.1.1., 4.2.1.2., 4.2.1.3. pontok alatt tárgyalt kutatások célkitűzéseit, a kísérleti körülményeket és a téma összefoglalását, illetve a következtetéseket összevonom, tekintettel a logikai egybetartozásra.

Célkitűzések

Az irodalmi előzmények alapján ebben a tanulmányban azt a feladatot tűztük ki célul, hogy in vivo igazoljuk a *Sempervivum tectorum*-kivonat bioaktív vegyületeinek antioxidáns, gyökfogó és membránstabilizáló hatását, patkányokban. Bizonyítsuk be, hogy a természetes eredetű polifenolok és flavonoidok hatása befolyásolja a májmikroszóma kevertfunkciójú oxidáz rendszerének működését. Tanulmányozzuk a kivonat hatását a lipidanyagcserére, és az immunreaktivitásra, valamint a kapott eredményeket hasonlítsuk össze az E-vitamin és a silibinin ismert antioxidáns vegyületek vizsgálati eredményeivel.

Kísérleti körülmények

Állatkísérleteinkben alimentáris hyperlipidaemiát idéztünk elő 2 % koleszterint, 0,5 % kólsavat és 20 %-os napraforgóolajat tartalmazó patkánytáp „short term” etetésével (Blázovics 1992). A 8-14 napig tartó diéták alatt kialakult a hyperlipidaemia és a következményes zsírmáj. A kísérletek egy részében 3 %-os alkoholos oldatot is adtunk az állatoknak párhuzamosan az etetéssel (Fehér 1993). A szabadgyökös reakciók igazolására a diénkonjugátum-koncentrációt az AOAC (1984) módszere szerint, a MDA-koncentrációt tiobarbitursavas reakcióval (Jordan 1982) határoztuk meg. A szabadgyök-reakciók és a szöveti gyökfogó kapacitás vizsgálatához luminometriás módszereket fejlesztettünk ki MEDICOR-MEDILAB és Berthold Lumat 9501 készülékekre (Blázovics 1992). A szérumparamétereket Hitachi 717 klinikai automatán mértük a „Módszerek és anyagok” fejezetben ismertetett metodikák szerint. A májhomogenizátumok lipidfrakciónak zsírsavösszetételét gázkromatográfiásan határoztuk meg (Alexander 1985, Blázovics 2000). A MFO-rendszer vizsgálatakor meghatároztuk a NADPH- citoktóm c-reduktáz (Jansson 1977), NADH-citokróom b5-reduktáz aktivitásokat (Jansson 1977), a citokróom c- és citokróom b5-tartalmat (Omura 1964, 1964a).

Az immunreaktivitás vizsgálata lépmakrofágokon, a 3.8.1 - 3.8.5 pontok alatt leírt módszerekkel történt (Gonzalez-Cabello 1987, Müzes1989, 1989a). Vizsgáltuk a TNF- α és IL-1 citokinek koncentrációváltozását és a Con A-val kiváltott blasztosodást.

Eredmények 4.2.1.1.; 4.2.1.2.; 4.2.1.3

4.2.1.1. Szabadgyökös károsodások és antioxidáns védelem igazolása zsírmájban

A hyperlipidaemiát a szérumparaméterek meghatározásával ellenőriztük (9. táblázat).

(9. táblázat)

A szérum lipidparamétereinek változása hyperlipidaemiás patkányokban (átlag $\pm$ SEM)			
modell	TG (mmol/l)	CHOL (mmol/l)	HDL-CHOL (mmol/l)
normolipidaemia	1,250 $\pm$ 0,066	2,140 $\pm$ 0,150	1,153 $\pm$ 0,068
hyperlipidaemia	0,986 $\pm$ 0,056	11,674 $\pm$ 0,488	0,866 $\pm$ 0,012

A máj lipidfrakcióinak zsírsavösszetétel-változását gázkromatográfiásan vizsgáltuk (10. táblázat)

(Horváth 1993a).

10. táblázat

Zsírsavösszetétel változása hyperlipidaemiában (átlag $\pm$ szórás)		
zsírsav (n=20)	normolipidaemia (%)	hyperlipidaemia (%)
C16	16,2 $\pm$ 1,3	7,2 $\pm$ 0,4
C18	16,9 $\pm$ 0,6	4,8 $\pm$ 0,4
C18 1 ω 9	10,9 $\pm$ 0,6	22,7 $\pm$ 1,6
C18 2 ω 6	21,9 $\pm$ 1,5	45,9 $\pm$ 2,2
C20 4 ω 6	20,9 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,5
C22 6 ω 3	3,9 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,2

Mérési körülmények: Hewlett–Packard 5890, kolonna: SP2340 silica (60m x 0,32 mm, 0,25 μ m filmvastagság), hőmérséklet: kolonna: 220 °C, injektor: 220 °C, detektor: FID, injektor: split split ratio 1:50, karriergáz: hidrogén 1,5 cm³/min, detektorgáz: hidrogén 30,0 cm³/min, levegő: 400,0 cm³/min, nitrogén: 30,0 cm³/min (Horváth 1993a).

A zsírmáj kialakulását morfológiai vizsgálattal igazoltuk (Blázovics 1992). A 8 napig zsírdús tápon tartott állatok májának szövettani képe a következő jellemző változásokat mutatta fénymikroszkóp alatt: zsíros degeneráció, hólyagszerű sejtes degeneráció, centrilobuláris nekrozis. A májsejtek megduzzadtak, a sejthatárok összemosódtak, némelyik sejt teljesen nekrotizált. Gyulladásos folyamatokat azonban nem figyeltünk meg a máj parenchymájában (Blázovics 1992). A májszövet vizsgálata megerősítette, hogy a zsírdús táp etetése szignifikáns szöveti károsodást okozott.

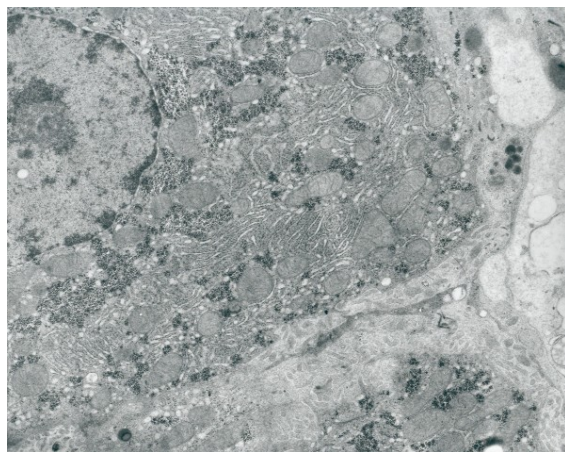
Az elektronmikroszkópos metszeteken a májsejtek nagy mennyiségű világos, membránnal körülvett vakuolumot (zsírcseppet) tartalmaztak. A zsírcseppek nagysága változó és néha szabálytalan alakú volt, de majdnem mindet vékony membrán határolta (33A. és 33B. ábra).

A lipidperoxidációs értékek szignifikáns növekedése, mint például a diénkonjugátum, tiobarbitursav-reaktív anyagok, kemilumineszcenciás fényintenzitás, pedig igazolta, hogy a szabadgyökös reakciók is szerepet játszottak a zsírmáj kialakulásában. Amennyiben E-vitamint (8,56 mg/ttkg/nap 9 napig, tápban) vagy silibinint (25 mg/kg/nap ip. 5 napig az etetés 4.napjától)

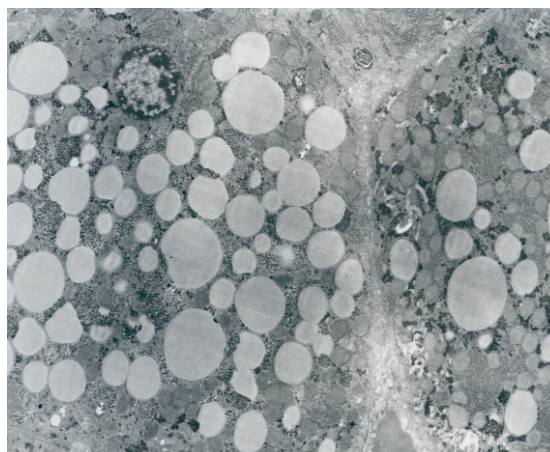
(Horváth 1993a, Fehér 1996) adtunk a patkányoknak, úgy mérséklődött a szabadgyök-képződés, és javult a májszövet morfológiai képe (Blázovics 1992) (34. ábra).

33A. és 33B. ábra Az egészséges és zsírmáj elektronmikroszkópos képe

33A. ábra Kontrollmáj



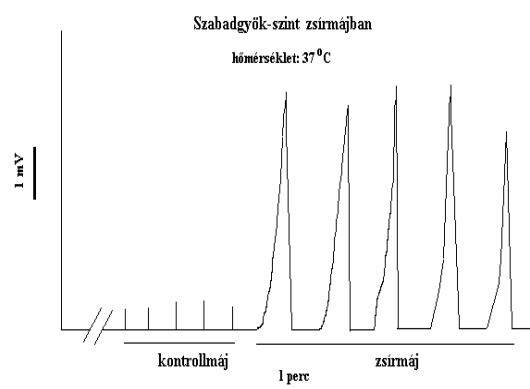
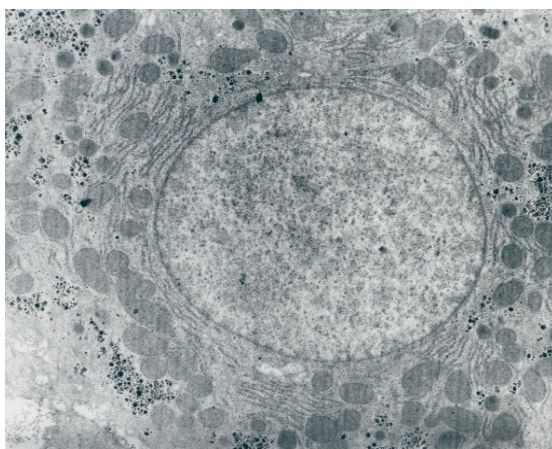
33B. ábra Zsírmáj



34. ábra

35. ábra

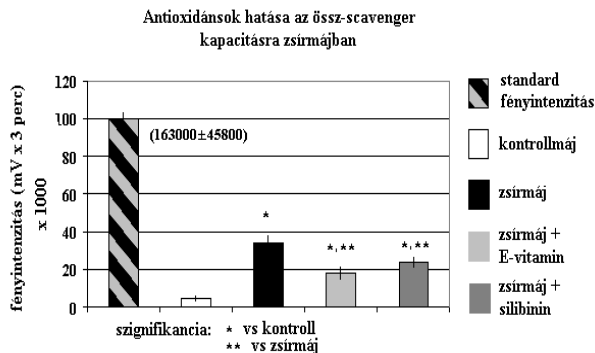
A zsírmáj regenerációja silibinin-kezelés után



A 35. ábrán látható, hogy míg a friss, egészséges májhomogenizátumban igen gyenge fényintenzitásokat mértünk, addig a zsírmáj-homogenizátumban már olyan molekulák, azaz szabad gyökök találhatók, amelyek képesek a luminolt gerjeszteni. Az egészséges májban a szabad gyök-antioxidáns egyensúly miatt mértük a gyenge fényintenzitást. A vizsgálatok leírása a 3.5.3.3. alatt található (Blázovics 1992).

A 36. ábra megerősít bennünket abban, hogy nemcsak a szabadgyökös reakciók fokozódtak zsírmájban, hanem a májkárosodás során csökkent a szövet össz-scavenger kapacitása is.

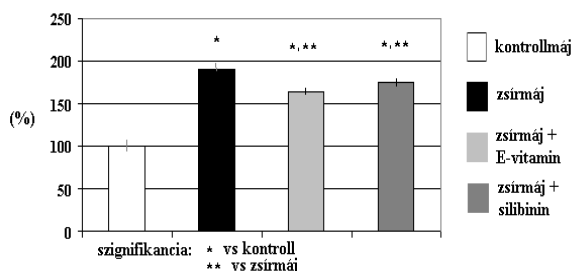
36. ábra



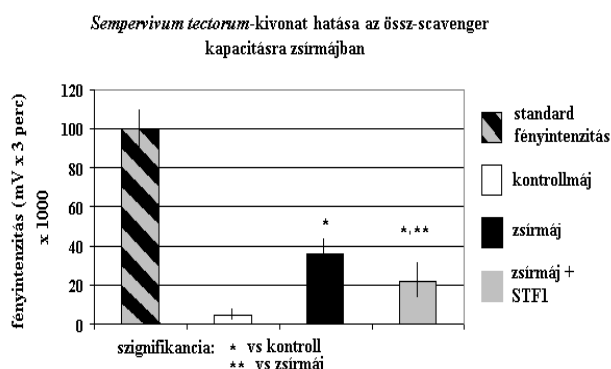
koncentrációban és időtartam alatt, vagyis a szerv kompenzálta a kívülről jött többlet antioxidáns hatást. A mérést H_2O_2/OH -luminol rendszerben végeztük. A standard fényintenzitás a szöveti gyökfogó kapacitás erősségétől függően csökkent. (A 36.-42. ábrákon a konfidenciahatárokat tüntettem fel.) A 37. ábra azt szemlélteti, hogy az E-vitamin- és a silibinin-kezelések kísérletes zsírmájban csökkentették a diénkonjugátum-tartalmat. A diénkonjugátum-tartalom és a

gyökfogó kapacitás között szoros negatív korreláció volt: $r = -0,96$; $p < 0,05$.

Diénkonjugátum-tartalom változása zsírmájban antioxidáns kezelés mellett



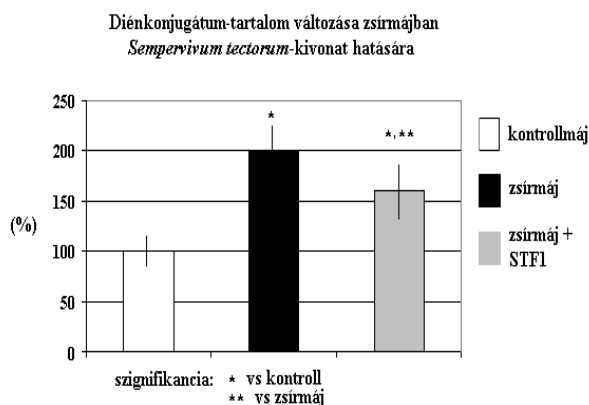
A 38. ábrán a STF1-kezelés eredményét mutatom be. A 2g/ttkg (9 napon át történő ad libitum itatása, párhuzamosan az etetéssel) dózisban adott vizes kivonat gyökfogó hatása hasonló volt az E-vitamin- (9 napig 8,56 mg/ttkg/nap a tápba keverve) és silibinin- (25 mg/kg/nap ip. 5 napig az etetés 4. napjától) kezelésekhez.



A 39. ábra a STF1 membránstabilizáló képességét igazolja, mert a kezelés hatására csökken a diénkonjugátum-tartalom. A mért paraméterek közötti negatív korreláció volt: $r = -0,99$; $p < 0,05$

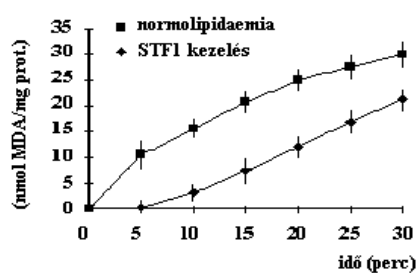
A STF1 in vitro és in vivo egyaránt képes volt csökkenteni az enzimatikus úton in vitro NADPH-val kiváltott és Fe^{3+} -mal stimulált lipidperoxidációt patkánymáj-mikroszómán. A mérési adatokból jól látható, hogy a nekrotikus máj mikroszomális enzimaktivitása rosszabb, mint az egészséges májé (40.-42.ábrák).

39. ábra



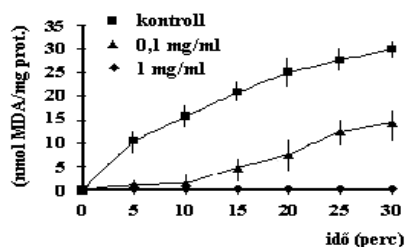
41. ábra

Az STF1-kivonat hatása a NADPH-kiváltott és vas-stimulált lipidperoxidációra patkánymáj-mikroszómán in vivo



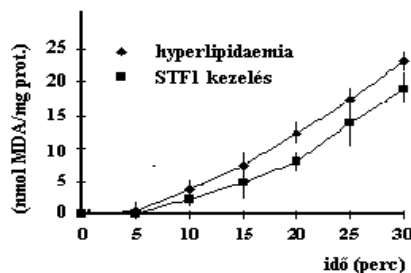
40. ábra

Az STF1-kivonat hatása a NADPH-kiváltott és vas-stimulált lipidperoxidációra patkánymáj-mikroszómán in vitro



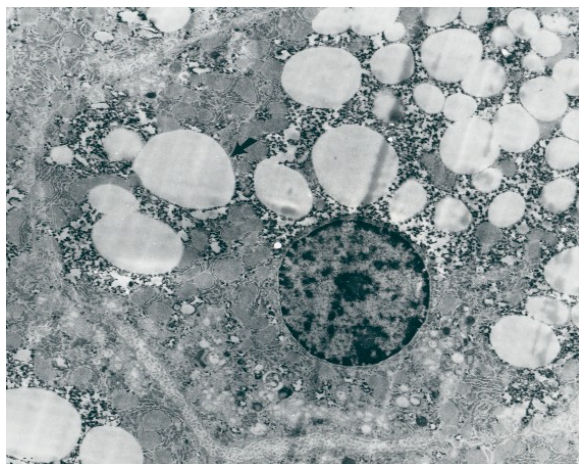
42. ábra

Az STF1-kivonat hatása a NADPH-kiváltott és vas-stimulált lipidperoxidációra patkánymáj-mikroszómán in vivo

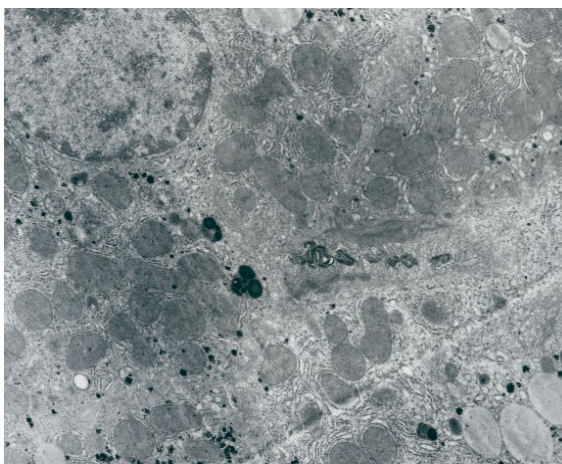


43A. és 43B. ábra Zsírmáj és *Sempervivum tectorum*-kivonattal kezelt zsírmáj elektronmikroszkópos képe

43.A. ábra Zsírmáj



43.B. ábra STF1-kezelt zsírmáj



Antioxidáns kezelésre a citoplazmában kisebb mértékű a lipidlerakódás, csökken a szöveti nekrozis, a ballonsejt–degeneráció, a vakuolizáció. STF1-kezelés után a májlebenyekék majdnem teljesen ép májsejtekből épültek fel, csak egy-egy májsejtben volt található néhány lipidcsepp. A hepatocitákban nagy mennyiségű glikogénszemcse is megfigyelhető volt (Fehér 1998, Blázovics 1995, 1993, 1999) (43A. és 43B. ábra).

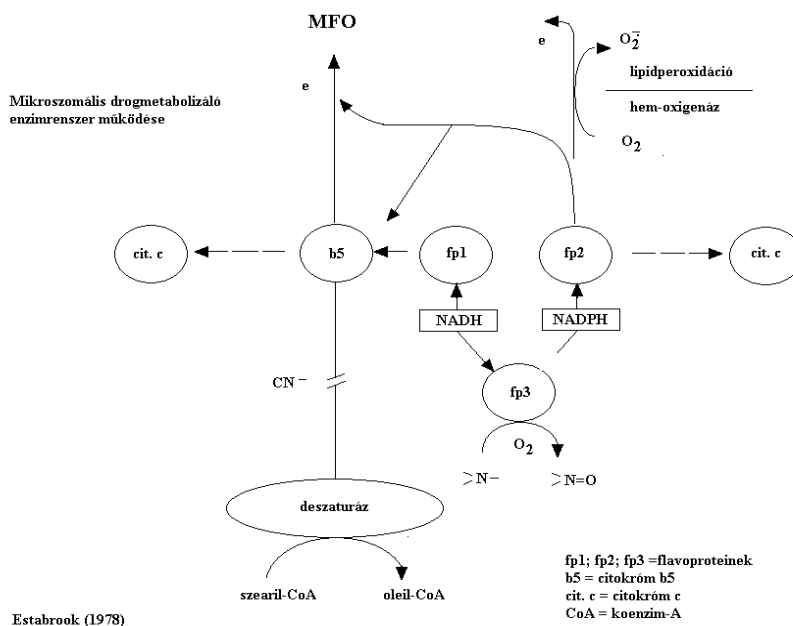
A drogmetabolizmus zsírmájban gátolt. Ennek oka többek között az, hogy a zsírmájban toxikus koncentrációban képződő szabad gyökök károsítják magát a mikroszomális enzimrendszert is a membránok lipidperoxidációja következtében, ezért a membránköthetű enzimek aktivitása csökken (Blázovics 2000).

4.2.1.2. Antioxidán terápia hatása a MFO-rendszerre zsírmájban

A mikroszomális kevertfunkciójú oxidáz (MFO-rendszer) kiemelt fontosságú szerepet játszik az endo- és xenobiotikumok oxidálásában, a detoxikálásban és a szabad gyökök generálásában. A MFO-rendszer működésében három flavoprotein, két hemoprotein és egy nem hemvastartalmú komponens vesz részt. A rendszerhez tartozik a telítetlen zsírsavak kialakulását katalizáló ciánszenzitív desaturáz is. A MFO-rendszerben fiziológiás és patológiás körülmények között egyaránt képződnek szabad gyökök (Goeptar 1995, Blázovics 2001). Korábbi tanulmányokból világossá vált, hogy a máj elzsírosodásának patomechanizmusában a mikroszomális MFO-enzimrendszer a korai fázisban aktiválódik, majd a szignifikáns lipidakkumuláció következtében az enzimrendszer csökkenő induktivitást és aktivitást mutat (Blázovics 1992, 1995, 2000). A lipidperoxidációs folyamatok felerősödése miatt súlyosan károsodnak a membránok és ennek következtében a sejtek nekrotizálódnak. Szintetikus antioxidánsokkal (CH 402, MTDQ-DS) és a flavonolignán silibininrel történt kezelések azt igazolták, hogy e vegyületek membránstabilizáló hatása a mikroszómákon is érvényre jut (Blázovics 1989).

A 44. ábra a MFO-rendszer működését modellezi Estabrook (1979) nyomán.

44. ábra



A MFO-rendszerben keletkező szabad gyökök forrása a [citokrómb5-Fe³⁺-szubsztrát O₂⁻] komplex bomlása közben keletkező szuperoxidion, az enzimatikus reakciók során termelődő H₂O₂-ből képződő ·OH-gyök és a NADPH-citokrómb5-reduktáz egy elektron oxigénnek történő átadásakor képződő szuperoxidion. Speciális esetben a NADPH-dehidrogenázról elektronok jutnak a citokrómb5-re is. Ez az enzim elektronokat küldhet a lipidek peroxidációs folyamataihoz, valamint a hem oxidatív átalakulását is katalizálja, ezáltal jelentős szerepet játszik a redox-homeosztázisban (Jansson 1977).

Korábbi kutatásainkból ismertté vált, hogy a silibinin-kezelés (ip. 25 mg/ttkg) „short term alimentáris hyperlipidaemiában” a kísérlet 4. napjától a 9-ik napon történő kivéreztetésekig) kedvezően befolyásolta a citokrómb5 és citokrómb5 fehérjék mennyiségének alakulását a mikroszómában zsírmájban, míg a kontrollmájokban az antioxidáns kezelés nem okozott változást. Hasonló eredményeket kaptunk a silibinin-kezelésre vonatkozóan a normolipidaemiás és hyperlipidaemiás (zsírmáj) állatok májmikroszóma NADPH-citokrómb5-reduktáz és citokrómb5-reduktáz aktivitás változásaira. A silibinin-kezelés gátolta a NADPH-citokrómb5-reduktáz által katalizált lipidperoxidációt is Fe³⁺ jelenlétében (Blázovics 1989). Annak igazolására, hogy a silibinin nemcsak lipidszintcsökkentő hatásán keresztül befolyásolta a lipidperoxidációt és a MFO-rendszer működését, az alábbi vizsgálatot végeztük el a KFKI munkatársai segítségével (György 1992). Az in vivo silibinnel kezelt normolipidaemiás patkányok májmikroszóma-preparátumait in vitro Co⁶⁰ γ-val besugarazzuk. A besugárzás dózisa 1,095 kGy/h volt. A besugárzás hatására csökkent NADPH-citokrómb5-reduktáz és NADH-citokrómb5-reduktáz aktivitásokat mértünk, mely aktivitások szignifikánsan magasabb értéket mutattak abban az esetben, ha silibinnel in vivo megkezeltek az állatokat. (A kezelések egyeztek a korábban ismertetett kísérletben alkalmazottakkal.) A kezelésekkal párhuzamosan

meghatároztuk a malondialdehid-tartalmat is, és azt kaptuk, hogy a $\text{Co}^{60} \gamma$ -besugárzás hatására közel 9-szeresére növekedett a MDA-koncentráció, és csupán 6,2-szer volt nagyobb a silibinin-kezelt, besugárzott mintában, tehát a silibinin gyökfogó aktivitása in vivo igazolható volt.

A májtömeg/testtömeg arány, a citokróm P450-, citokróm b5-koncentrációk, a NADPH-citokróm c-reduktáz és NADH-citokróm b5-reduktáz enzimek aktivitásértékei nem különböztek a normolipidaemiás és a normolipidaemiás STF1-kezelt csoportok között. Szignifikáns különbséget kaptunk ($p < 0,05$) a citokróm P450-, citokróm b5-tartalom és a NADH-citokróm b5-reduktáz aktivitásban és nem szignifikáns csökkenést a NADPH-citokróm c-reduktáz aktivitásban kísérletes zsírmájban. A STF1-kezelés (2g/ttkg/nap, 9 napon át) kedvező hatást mutatott, kivéve a citokróm b5-tartalmat. Az eredmények a 11. táblázatban láthatók. A STF1 bioaktív komponensei nem befolyásolták a MFO-rendszer működését az adott körülmények között még nagy dózisban sem. (Meg kell jegyeznünk, hogy a STF1 NADPH jelenlétében in vitro képes a citokróm c-t redukálni (Blázovics 1994b). Zsírmájban a szignifikánsan kisebb NADPH-citokróm c-reduktáz aktivitás miatt az in vitro enzimatikusan indukált lipidperoxidáció kisebb mértékű volt, mint normolipidaemiában. A STF1-kezelés mindkét esetben csökkentette a MDA képződését (Blázovics 2000). A 40.-42. ábrák a 4.2.1.1. fejezetben találhatók.

11. táblázat

<i>Sempervivum tectorum</i> -kivonat in vivo hatása a máj MFO-rendszerére					
minták	normolipidaemia (átlag $\pm$ h1;h2)		hyperlipidaemia (átlag $\pm$ h1;h2)		Signifikancia $p < 0,05$
	STF1 nélkül (1. csoport)	STF1-kezelés (3. csoport)	STF1 nélkül (2. csoport)	STF1-kezelés (4. csoport)	
NADPH-citokróm P450-reduktáz (nmol red. cit. c mg prot.x min)	89,92 $\pm$ 18,64	84,22 $\pm$ 11,240	56,82 $\pm$ 17,97	78,86 $\pm$ 13,13	n.sz.
NADH ferricianid reduktáz (nmol ferrocianid mg prot.x min)	* 2461,8 $\pm$ 386,4	2273,0 $\pm$ 279,7	** 1666,8 $\pm$ 397,0	2187,0 $\pm$ 379,9	*vs**
citokróm P450-tartalom (nmol/mg prot.)	* 0,530 $\pm$ 0,106	0,556 $\pm$ 0,132	** 0,350 $\pm$ 0,043	*** 0,480 $\pm$ 0,070	* vs** **vs ***
citokróm b5-tartalom (nmol/mg prot.)	* 0,419 $\pm$ 0,025	0,411 $\pm$ 0,031	** 0,286 $\pm$ 0,079	** 0,287 $\pm$ 0,081	*vs **
májtömeg testtömeg	0,0413 $\pm$ 0,011	0,0419 $\pm$ 0,012	0,0506 $\pm$ 0,009	0,0467 $\pm$ 0,008	n.sz.

12. táblázat

A STF1-kezelés hatása a szérumparaméterekre kísérletes hyperlipidaemiában					
minták	ALP	GOT	GPT	GGT	GOT/GPT

($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	(U/l)	(U/l)	(U/l)	(U/l)	
normolipidaemia (n=10)	838,0 $\pm$ 31,65	201,70 $\pm$ 9,61	73,50 $\pm$ 3,22	0,7 $\pm$ 0,15	2,74
normolipidaemia +STF1-kezelés (n=10)	793,40 $\pm$ 30,39	171,60 $\pm$ 4,17	72,60 $\pm$ 1,32	0,7 $\pm$ 0,15	2,36
hyperlipdaemia (n=10)	2235,90 $\pm$ 103,84	197,30 $\pm$ 8,91	111,00 $\pm$ 3,20	1,5 $\pm$ 0,16	1,77
hyperlipdaemia +STF1-kezelés (n=10)	1602,70 $\pm$ 44,25	171,30 $\pm$ 5,27	89,90 $\pm$ 2,26	1,4 $\pm$ 0,16	2,09
szignifikancia p<0,05	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 sz. 1 vs 4 sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4 sz. 3 vs 4 sz.	1 vs 2 sz. 1 vs 3 n.sz.. 1 vs 4 sz. 2 vs 3 n.sz. 2 vs 4 n.sz. 3 vs 4 sz.	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 sz. 1 vs 4 sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4 sz. 3 vs 4 sz.	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 sz. 1 vs 4 sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4 sz. 3 vs 4 n.sz.	

Az in vivo STF1-kezelés eredményességét hyperlipidaemiában a szérumparaméterek vizsgálatával is ellenőriztük. A 12.-14. táblázatok a kezelések hatását mutatják patkányokban.

13. táblázat

A STF1-kezelés hatása a szérumparaméterekre kísérletes hyperlipidaemiában				
minták ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	glükóz (mmol/l)	TG (mmol/l)	CHOL (mmol/l)	HDL-CHOL (mmol/l)
normolipidaemia (n=10)	8,56 $\pm$ 0,22	1,25 $\pm$ 0,06	2,14 $\pm$ 0,15	1,153 $\pm$ 0,215
normolipidaemia +STF1-kezelés (n=10)	7,58 $\pm$ 0,10	0,81 $\pm$ 0,03	1,80 $\pm$ 0,01	1,279 $\pm$ 0,36
hyperlipdaemia (n=10)	8,88 $\pm$ 0,09	0,98 $\pm$ 0,05	11,67 $\pm$ 0,48	0,866 $\pm$ 0,04
hyperlipdaemia +STF1-kezelés (n=10)	8,04 $\pm$ 0,29	1,05 $\pm$ 0,06	8,92 $\pm$ 0,34	1,511 $\pm$ 0,281
szignifikancia p<0,05	1 vs 2 sz. 1 vs 3 sz. 1 vs 4 n.sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4 n.sz. 3 vs 4 sz.	1 vs 2 sz. 1 vs 3 sz. 1 vs 4 sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4 sz. 3 vs 4 n.sz.	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 sz. 1 vs 4 sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4 sz. 3 vs 4 sz.	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 sz. 1 vs 4 n.sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4 n.sz. 3 vs 4 sz.

14. táblázat

A STF1-kezelés hatása a szérumparaméterekre kísérletes hyperlipidaemiában				
minták ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	Tbil ($\mu\text{mol/l}$)	BUN (mmol/l)	CREA (mmol/l)	TP (g/l)
normolipidaemia (n=10)	1,85 $\pm$ 0,36	7,34 $\pm$ 0,19	48,10 $\pm$ 1,19	58,90 $\pm$ 0,79
normolipidaemia +STF1-kezelés (n=10)	1,50 $\pm$ 0,16	6,76 $\pm$ 0,29	49,30 $\pm$ 0,76	58,20 $\pm$ 0,53
hyperlipdaemia (n=10)	2,17 $\pm$ 0,35	7,01 $\pm$ 0,21	48,10 $\pm$ 0,56	60,10 $\pm$ 0,70

hyperlipidaemia +STF1-kezelés (n=10)	1,70 ± 0,48	7,64 ± 0,27	49,90 ± 2,01	61,80 ± 0,55
szignifikancia p<0,05	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 sz. 1 vs 4 n.sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4 n.sz. 3 vs 4 sz.	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 n.sz. 1 vs 4 sz. 2 vs 3 n.sz. 2 vs 4 sz. 3 vs 4 sz.	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 n.sz. 1 vs 4 n.sz. 2 vs 3 n.sz. 2 vs 4 n.sz. 3 vs 4 n.sz.	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 n.sz. 1 vs 4 sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4 sz. 3 vs 4 n.sz.

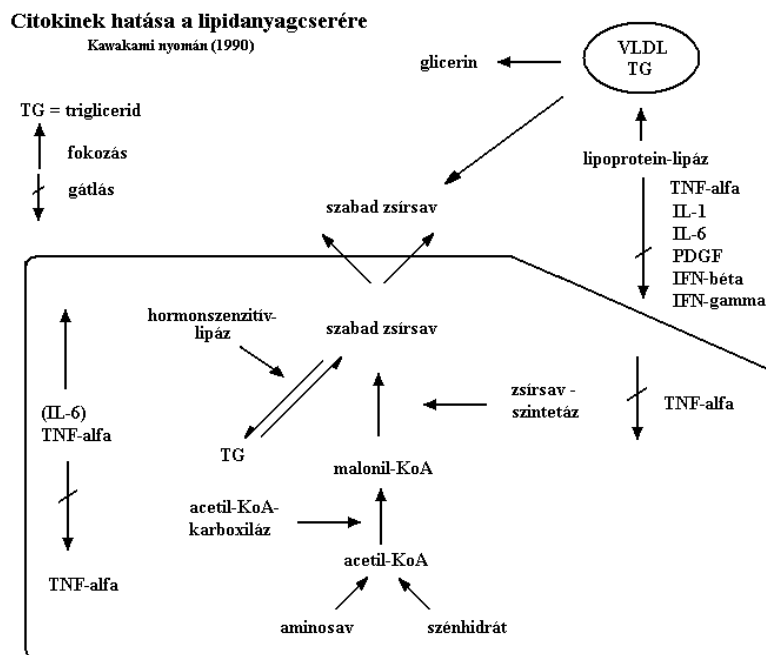
4.2.1.3. Antioxidánsok hatása az immunfolyamatokra

A hyperlipidaemia elnyomja a celluláris immunválaszt, gátolja a mitogénindukált limfocita blasztos transzformációt, csökkenti a TNF- α -aktivitást és a spontán IL-1-aktivitást, ugyanakkor a citokinek fontos szerepet játszanak a lipidanyagcsere szabályozásában (Somogyi 1987, Shimano 1990, Blázovics 1994a, 1996b).

Korábbi kutatásainkban, melyet a „2.7.3. Antioxidánsok hatása a prosztanoidok és citokinek képződésére” című fejezetben már ismertettem, a silibinin és az E-vitamin külön-külön is jó hatást fejtett ki, de együttesen adva szignifikánsan javította az immunfunkciókat hyperlipidaemiában (Gonzalez-Cabello 1992, Horváth 1993, Fehér 1996, Blázovics 1996b).

Abból a megfontolásból, hogy a STF1 hatóanyagai között számos antioxidáns molekula van, mint például a kvercetin és kempferol, arra voltunk kíváncsiak, hogy a gyökfogó és lipidszintcsökkentő tulajdonságokon túl bizonyítható-e egyéb, az immunreaktivitást befolyásoló hatás, mert az irodalomból ismertté vált, hogy a kvercetin gátolja a lipoxigenázok aktivitását, a kempferol pedig COX2-blokkoló és iNOS-indukáló tulajdonságú (Polya 2002, Blázovics 2000). Az irodalmi összefoglalásban a „2.2. Lipidanyagcsere, citokinek” pont alatt részletesen kifejtettem a PG-bioszintézis, az immunrendszer és a lipidanyagcsere között eddig feltárt kapcsolatokat is (45. ábra) (Kawakami 1990, Blázovics 2004).

45. ábra



Eredmények

Ezekben a kísérletekben az etetés és kezelés megegyezett a 4.2.1.2. pont alatt alkalmazottakkal. Az alábbi 15.-17. táblázatokban foglaltam össze a kapott immunbiokémiai adatokat. A STF1-kezelés hatását megvizsgáltuk a konkanavalin-A-val stimulált limfociták blasztos transzformációjára. Bár szignifikáns változást csak 1 mg/ml Con-A mellett kaptunk, a nagyobb koncentrációknál is kedvező irányú eltérést tapasztaltunk az antioxidáns kezelés hatására a hyperlipidaemiás állatoknál (15. táblázat). A 16. táblázatban az IL-1 aktivitásértékeket látjuk 20 µg/ml lipopoliszachariddal (E. coli 0111:B4 LPS) kezelt és kezeletlen lép-makrofágokban. A STF1-kezelésre az LPS-sel kiváltott IL-1-aktivitást nézve nem különbözött a kontrollcsoport a hyperlipidaemiás csoporttól, illetve az antioxidánsal is kezelt beteg állatok csoportjától. A spontán IL-1-termelés azonban úgy tűnik, hogy kismértékben módosul a kontrollok értékei irányában a terápia alatt.

15. táblázat

<i>Sempervivum tectorum</i>-kivonat hatása a patkánylép limfocita blasztos transzformációjára				
timidinbeépülés cpm (átlag ± SEM)				
minták (n=10)	nem kezelt	Con-A kezelt (µg/ml)		
		1	5	10
normolipidaemia	675 ± 65	13168 ± 755	42586 ± 7114	40350 ± 7848
hyperlipidaemia	453 ± 50	7422 ± 1701	11224 ± 2966	9163 ± 2818
hyperlipidaemia + STF1	443 ± 84	12280 ± 1353	15052 ± 769,8	12573 ± 547
szignifikancia	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 n.sz. 2 vs 3 n.sz.	1 vs 2 sz. < 0,01 1 vs 3 n.sz. 2 vs 3 sz. < 0,05	1 vs 2 sz. < 0,01 1 vs 3 sz. < 0,02 2 vs 3 n.sz.	1 vs 2 sz. < 0,02 1 vs 3 sz. < 0,05 2 vs 3 n.sz.

16. táblázat

<i>Sempervivum tectorum</i>-kivonat hatása a lépmakrofágok IL-1- aktivitására timidinbeépülés cpm (átlag ± SEM)			
minták (n=10)	nem kezelt	LPS kezelt (20 µg/ml)	p
normolipidaemia	762 ± 163	1939 ± 209	< 0,001
hyperlipidaemia	1383 ± 227	1864 ± 155	n.sz.
hyperlipidaemia + STF1	1087 ± 168	1884 ± 200	< 0,05
szignifikancia	1 vs 2 < 0,02 1 vs 3 n.sz. 2 vs 3 n.sz.	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 n.sz. 2 vs 3 n.sz.	

17. táblázat

<i>Sempervivum tectorum</i>-kivonat hatása a lépmakrofágok TNF-α-aktivitására citotoxicitás (% ± SEM)			
minták (n=10)	nem kezelt	LPS kezelt (20 µg/ml)	p
normolipidaemia	5,56 ± 4,58	30,36 ± 5,19	< 0,01
hyperlipidaemia	- 15,30 ± 9,30	0,3 ± 7,70	n.sz.
hyperlipidaemia + STF1	- 22,77 ± 1,91	21,85 ± 3,34	< 0,001
szignifikancia	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 sz. < 0,01 2 vs 3 n.sz.	1 vs 2 sz. < 0,05 1 vs 3 n.sz. 2 vs 3 sz. < 0,01	

A TNF- α -aktivitás vizsgálata során a 20 µg/ml lipopoliszachariddal (*E. coli* 0111:B4 LPS) kiváltott citokintermelést a STF1-tal történő kezelés a kontrollértékhez közelítette a hyperlipidaemiás állatokban, míg a spontán TNF- α -termelésre ilyen nagymértékű hatást nem fejtett ki az antioxidáns terápia (17. táblázat). Ezek az adatok megerősítik a népi megfigyeléseket, miszerint a *Sempervivum tectorum* gyulladáscsökkentő hatása miatt vált általánosan elfogadottá Európában.

Következtetések

A zsírmáj gyakori betegség, mely jól modellezhető zsírdús táp etetésével. Zsírmájban felerősödnek a szabadgyökös reakciók és csökken az antioxidáns védekezés. A mikroszomális kevertfunkciójú oxidázok aktivitása a lipidperoxidációs folyamatok miatt gyengül. A diéta n-6 és n-3 zsírsavai befolyásolják a rendszer membránkötött enzimeinek aktivitását (Saito 1994). Hyperlipidaemiában meggyengül a celluláris immunválasz is.

Az antioxidáns, membránstabilizáló és gyökfogó silibinin-kezelés során igazoltuk, hogy a polifenolos vegyületek eljutnak a májba és kedvező hatásukat a MFO-rendszerre is kifejtik alimentáris eredetű zsírmájban. Igazolást nyert, hogy nemcsak a lipidszintcsökkentő hatás miatt következik be regresszió zsírmájban, hanem a direkt gyökfogó képesség következtében is

(Blázovics 1992, Fehér 1996, Blázovics 2002). Az E-vitamin alimentáris hyperlipidaemiában az alkalmazott dózisban nem befolyásolta a lipidanyagcserét. A kezelés fokozta a májszövet természetes gyökfogó-kapacitását, csökkentette a máj diénkonjugátum-tartalmát és gátolta a mikroszómákon *in vitro* kiváltott lipidperoxidációt. E-vitamin hatására a szabadgyökös reakciók intenzitása csökkent (Horváth 1993, Blázovics 1996b).

A STF1-kezelések kapcsán tehát az volt a kérdésünk, hogy vajon megnyilvánul-e az *in vitro* tapasztalt antioxidáns hatás *in vivo* is. Másrészt a készítmény bioaktív hatóanyagai befolyásolják-e a MFO-rendszert a májban. Kifejeződik-e antilipaemiás hatás a kezelés alatt, és változik-e a membránkött enzimek aktivitása (Blázovics 1993, 1993a, 1994a, 2000)? A leggyakrabban előforduló kvercetin és kempferol, mely a STF1-nak is domináns flavonoidjai, befolyásolják-e az immunrendszer aktivitását. Van-e különbség az egyes antioxidáns készítmények hatása között?

A STF1 módosítja a citokinek termelődését alimentárisan kiváltott hyperlipidaemiában. Megfigyeltük, hogy a STF1 kedvezően befolyásolta a konkanavalin-A stimulált lépsejt blast-transzformációt, a lipopoliszacharid-triggerelt TNF- α -termelést és a spontán IL-1-aktivitást hyperlipidaemiában. A kivonat mérsékelte a zsírmájban kialakult diffúz hepatocelluláris degenerációt és növelte a májszövet természetes antioxidáns kapacitását, melynek következtében szignifikáns regresszió volt megfigyelhető a kezelés alatt (Blázovics 1994a, 1996b).

In vitro és *in vivo* is érvényre jutott a STF1 antioxidáns hatása, amit a patkánymájmikroszómákon enzimatikusan kiváltott lipidperoxidáció gátlásával bizonyítottunk mind normo-, mind hyperlipidaemiában (40.- 42. ábrák). Az eltérő enzimaktivitás-értékek azzal magyarázhatók a két antioxidáns kezelést nem kapott diétás-csoport között, hogy a mikroszóma NADPH-citokróm P450-reduktáz aktivitása hyperlipidaemiával társult zsírmájban kisebb aktivitást mutat, mint normolipidaemiában a nekrotikus folyamatok következtében, melyet szövettanilag is igazoltunk (33A., 33B. ábrák) (Blázovics 1992, 2000). A gázkromatográfiás tanulmányok rávilágítottak arra, hogy a zsírsavösszetétel szignifikánsan megváltozott hyperlipidaemiában, amely ezáltal befolyásolta a NADPH-citokróm P450-reduktáz enzimaktivitást is (10. táblázat) (Goeptar 1995, Saito 1994). STF1-kezelés hatására a NADPH-citokróm c-reduktáz, NADH-ferricianid-reduktáz aktivitás és a citokróm b5-tartalom kedvezően változott, bár a javulás nem volt szignifikáns. A kezelésre szignifikánsan nőtt a citokróm P450-tartalom. A májtömeg/testtömeg arány a STF1-kezelés következtében szintén növekedett, és megközelítette a normolipidaemiás állatokban mért arányokat (Fehér 1998, Blázovics 2000). Ezekből az adatokból arra lehetett következtetni, hogy a STF1 hatóanyagai a citokintermelés módosításán keresztül hatnak a lipidanyagcserére és az antioxidáns karakter pedig mérsékli a lipidperoxidációs folyamatokat, aminek következtében javul az immunrendszer aktivitása.

4.2.2. Antioxidánsok hatása a máj regenerációjában partialis hepatectomia modellben

Amióta ismertté vált, hogy a szabadgyökös reakciók meghatározó szerepet játszanak a sejtprolifерáció, apoptózis és nekrosis folyamataiban, és kiderült, hogy számos polifenolos vegyület közvetlenül vagy közvetve hatással van a citokinek termelésére, illetve ezen keresztül a lipidanyagcserére, egyre nagyobb érdeklődéssel kutatják az antioxidánsok élettani és kórélettani hatásait (Fukunishi 1991, Cheeseman 1986, Marubayashi 1988). (Lásd a 2.7.2. fejezetet!).

A polifenolos vegyületek, a flavonol kvercetin és kempferol a napi flavonoidfogyasztás meghatározó összetevői. Gyakorlatilag az általánosan használt zöldségféléink, gyümölcsök legtöbbjében megtalálhatóak (Edwards 1979, Sahu 1994, Formica 1995, Hollman 1997, Manach 1997, Bravo 1998). A kivonatnak membránprotektív, immunstimuláns és antioxidáns hatása kifejeződött a nekrotikus folyamatok regressziójában „short term” kísérletekben.

Korábban tanulmányoztuk a máj regenerációját partialis hepatectomiát követően 24, 48, 72 órával és 3 hét után patkányokban. E kísérletekből kiderült, hogy a 70 %-ban eltávolított máj már 72 óra alatt képes volt normális funkcióját ellátni, és három hét után a megmaradt máj már eredeti súlyát is elérte (Horváth 1993). E modell alkalmasnak bizonyult antioxidánsok tesztelésére is (Blázovics 1993a). Vizsgálatainkat partialis hepatectomia modellben az indokolta, hogy a máj regenerációja során megjelenik a zsírmáj (Katagiri 1988, Tijburg 1991) illetve az RNS-szintézis aktivációját a lipidperoxidációs folyamatok felerősödése, míg a DNS-szintézis aktivációját a szabadgyökös folyamatok visszaszorulása kíséri (Nemirowskii 1987). A máj partialis hepatectomiáját követő regeneráció során hyperplasia figyelhető meg, és ebben a szakaszban jelentős a szabadgyökös tevékenység (Deliconstantinos 1983, Cheeseman 1986, Noguchi 1989, Okuyama 1991). Az antioxidáns védelmi rendszer gyengülését CoQ10-kezeléssel lehetett javítani (Marubayashi 1988).

Slater (1990) kutatásai során megfigyelte, hogy partialis hepatectomiát követően a mikroszóma α -tokoferol-tartalma már 24 órával a műtét után szignifikánsan megnő. A zsírdékony E-vitamin szintjének növekedése feltételezhetően összefügg a lipidek akkumulációjával. A citokinek a sejtek közötti kommunikáció esszenciális molekulái, melyek befolyásolják az aminosavak, fehérjék, szénhidrátok, lipidek és fémek intermedier anyagcseréjét. A máj a citokinszintézis fontos helye. A citokinek fontos szerepet játszanak a májbetegségekben és a máj regenerálódásában (Andus 1991).

Célkitűzés

Mivel a STF1 zsíryanycsere-zavarban javította a máj redox-homeosztázisát, arra voltunk kíváncsiak, hogy a készítmény milyen hatással van a májsejtek proliferációjára partialis hepatectomiában. A készítmény milyen mértékben befolyásolja a redox-homeosztázist?

Kísérleti körülmények

A STF1-kezelés dózisa 2g/ttkg/nap volt. A kezelés ad libitum történt a napi folyadékfogyasztással. Öt napon át előkezeltük az állatokat, majd a műtétet követő három napon keresztül tovább folytattuk a kezelést.

A hím Wistar patkányok 70 %-os partialis hepatectomiáját mély narcosisban végeztük a „Módszerek és anyagok” 3.2.2. pontjában leírtaknak megfelelően. Az állatok feláldozása során az abdominális vénából punkcióval vért vettünk, meghatároztuk a szérumenzimek aktivitását és a metabolitok koncentrációit Hitachi 717 kémiai automatával. Meghatároztuk a májtömeg/testtömeg arányt, a diénkonjugátum-koncentrációt (AOAC 1984) és a redox-homeosztázist ellenőrző kemilumineszcenciás értékeket a májból (Blázovics 1993a). A lép-makrofágok citokintermelő képességét a 3.8.1.-3.8.5. pontok szerint tanulmányoztuk (Gonzalez-Cabello, 1987, Müzes 1989, 1989a). (Előkísérletekben vizsgáltuk a laparotomia hatását az immunreakciókra, és megállapítottuk, hogy 72 órával a műtét után nincs szignifikáns különbség patkányok esetében a kontrollcsoportok és az álműtöttek között a lép-makrofág TNF- α - és IL-1-termelésében, illetve a Con-A-val kiváltott blasztosodásban, ezért ezeket a költséges vizsgálatokat a továbbiakban nem végeztük el.)

Eredmények

A kontroll és álműtött állatok vizsgált paraméterei között nem volt szignifikáns különbség. A szérummájenzim-aktivitások változásai jól mutatták az operáció eredményeként várható nagyobb értékeket, bár csak az ALP esetében volt a növekedés szignifikáns. A metabolitok esetében csak a összbilirubin-szint emelkedett meg a műtött állatokban, a többi mért értékben nem volt szignifikáns változás. A trigliceridek és a koleszterin koncentrációi nőttek a műtött állatok szérumában. A STF1-kezelés hatására az ALP-szérumaktivitás normalizálódott, a TBIL-érték csökkent, jelezve, hogy a máj regenerálódott. A kezelés eredményeként a TG és a koleszterin szintje szignifikánsan csökkent (18. és 19. táblázat). E változások gyakorlatilag megfelelnek az irodalomban leírtakkal, ugyanis a zsír a májban akkumulálódik, ami azért fontos, hogy a fehérjeszintézis során képződő proteinek be tudjanak épülni a membránstruktúrákba és ezáltal tovább folytatódjon a regeneráció (Blázovics 1993a, 2002). A 18.-20. táblázatok mutatják a szérumértékek alakulását a kontroll, álműtött, műtött és kezelt állatoknál.

18. táblázat

Szérumparaméterek partialis hepatectomiában					
minták (átlag ± SEM)	ALP (U/l)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	GGT (U/l)	GOT/GPT
kontroll (n=6)	976,9 ± 24,60*	228,2 ± 21,9	73,50 ± 8,70	1,10 ± 0,33	3,10
álműtött (n=6)	811,0 ± 26,94*	206,6 ± 6,90	72,16 ± 2,49	1,33 ± 0,20	2,86
operált (n=6)	1571 ± 33,88**	315 ± 10,65	123,0 ± 7,52	4,16 ± 0,45	2,56
operált + STF1-kezelt (n=6)	749,0 ± 37,92*	270,0 ± 7,50	86,50 ± 2,40	2,50 ± 0,22	3,12
szignifikancia p<0,05	1 vs 2 sz. 1 vs 3 sz. 1 vs 4 sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4 sz. 3 vs 4 sz.	1 vs 2 sz. 1 vs 3 sz. 1 vs 4 sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4 sz. 3 vs 4 sz.	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 sz. 1 vs 4 sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4 sz. 3 vs 4 sz.	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 sz. 1 vs 4 sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4 sz. 3 vs 4 sz.	

19. táblázat

Szérumparaméterek partialis hepatectomiában					
minták (átlag ± SEM)	TBIL (mmol/l)	glükóz (mmol/l)	BUN (mmol/l)	CREA (mmol/l)	TP (g/l)
kontroll (n=6)	1,85 ± 0,35	7,80 ± 0,61	7,70 ± 0,43	47,85 ± 3,05	62,10 ± 0,28
álműtött (n=6)	1,80 ± 0,09	7,81 ± 0,17	7,71 ± 0,10	47,16 ± 0,05	64,0 ± 0,57
operált (n=6)	3,33 ± 0,54	7,00 ± 0,31	6,65 ± 0,27	49,83 ± 1,24	59,60 ± 0,61
operált + STF1-kezelt (n=6)	2,33 ± 0,21	6,96 ± 0,26	6,18 ± 0,15	49,66 ± 0,76	63,83 ± 0,83
szignifikancia p<0,05	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 sz. 1 vs 4 sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4 sz. 3 vs 4 sz.	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 sz. 1 vs 4 sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4 sz. 3 vs 4 n.sz.	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 sz. 1 vs 4 sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4 sz. 3 vs 4 sz.	1 vs 2 n.sz. 1 vs 3 n.sz. 1 vs 4 n.sz. 2 vs 3 n.sz. 2 vs 4 n.sz. 3 vs 4 n.sz.	1 vs 2 sz. 1 vs 3 sz. 1 vs 4 sz. 2 vs 3 sz. 2 vs 4n.sz. 3 vs 4 sz.

Az operáció következtében növekedett a spontán limfoblaszt-transzformáció, és a STF1-kezelés fokozta a lépsejtek proliferációs aktivitását (46. ábra). A Con-A-val stimulált blasztoz transzformáció viszont szuppresszáldott partialis hepatectomiában. A STF1 hatására ismét fokozódott a blasztosodás a lobectomia ellenére (46. ábra).

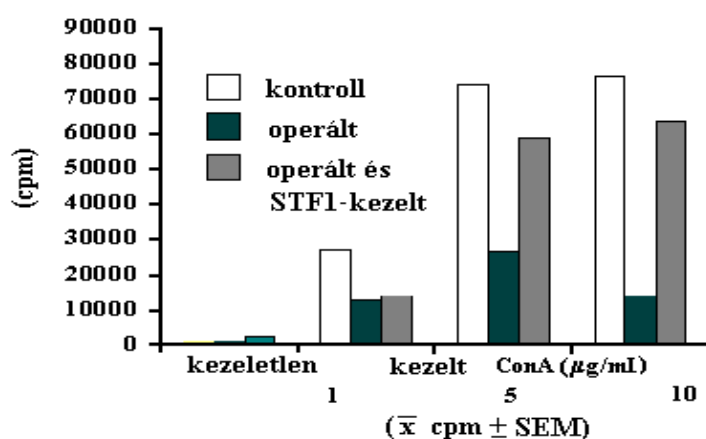
20. táblázat

Szérumparaméterek partialis hepatectomiában		
minták (átlag ± SEM)	CHOL (mmol/l)	TG (mmol/l)
kontroll (n=6)	1,85 ± 0,11 *	1,201 ± 0,26*
álműtött (n=6)	1,96 ± 0,06	1,197 ± 0,04*

operált (n=6)	2,13 ± 0,08**	1,440 ± 0,016**
operált + STF1-kezelt (n=6)	1,60 ± 0,07***	0,605 ± 0,032***
szignifikancia p<0,05 a különböző számú *-gal jelölt értékek között		

46. ábra

***Sempervivum tectorum*-kivonat hatása a patkánylég-
limfocita blasztos transzformációjára partialis hepatectomiában**



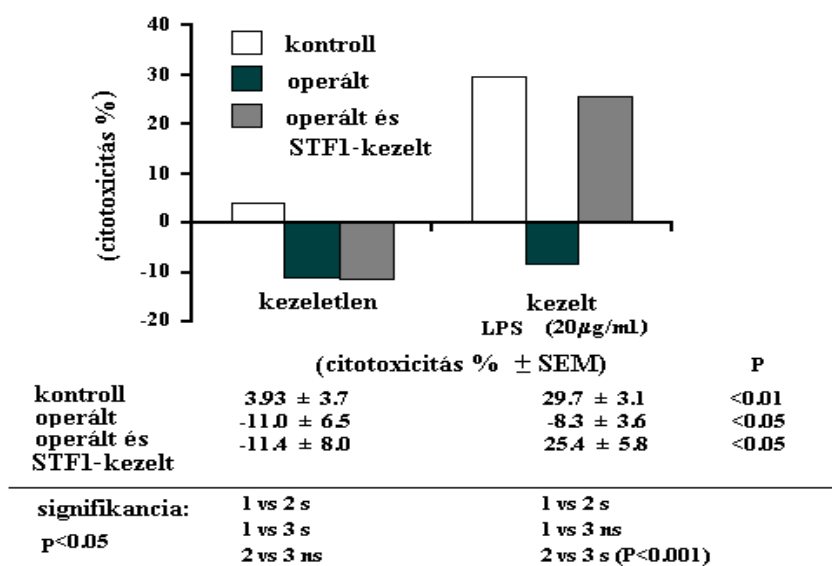
kontroll	1079.3 ± 135.1	27143 ± 1987.8	74354 ± 2425.2	76779 ± 3085.5
operált	1060.2 ± 69.5	13177 ± 1272.1	27052 ± 2234.1	22035 ± 2147.7
operált és STF1-kezelt	2706.8 ± 204.3	22770 ± 2348.6	58963 ± 2764.4	63395 ± 2533.7

signifikancia:	1vs2 ns	1vs2 s	1vs2 s	1vs2 s
p<0.05	1vs3 s	1vs3 ns	1vs3 s	1vs3 ns
	2vs3 s	2vs3 s	2vs3 s	2vs3 s

A STF1 aktív komponensei gátolták a lépmakrofágok spontán TNF- α -kiáramlását a lobectomizált állatokban, de a TNF- α -aktivitás LPS hatására növekedett az antioxidáns kezelés következtében. A fokozott TNF- α -kiáramlás citotoxicitását jól lehetett mérni Hep-2 adherens emberi epifarinx-carcinoma-sejteken, és a hatás erőssége megközelítette a nem műtött állatoknál mért értéket. Az operált állatokban az LPS hatása nem jelentkezett. Az eredményeket a 47. ábra szemlélteti. A lépmakrofágok spontán IL-1-kiráramlása szignifikánsan nagyobb volt a hepatectomizált állatokban, és ezt a STF1-kezelés alig befolyásolta. Az IL-1-aktivitás LPS jelenlétében mind a kontroll, mind a műtött állatokban szignifikánsan megemelkedett, melyet az antioxidáns kezelés tovább fokozott (48. ábra).

47. ábra

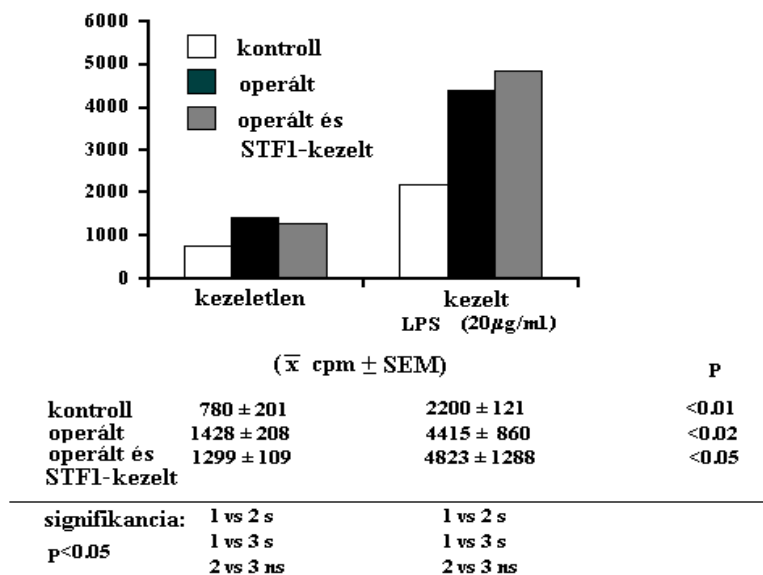
Sempervivum tectorum-kivonat hatása a patkánylég-makrofágok
TNF-alfa- aktivitására partialis hepatectomiában



48. ábra

Sempervivum tectorum-kivonat hatása a patkánylég-makrofágok
IL-1-aktivitására partialis hepatectomiában

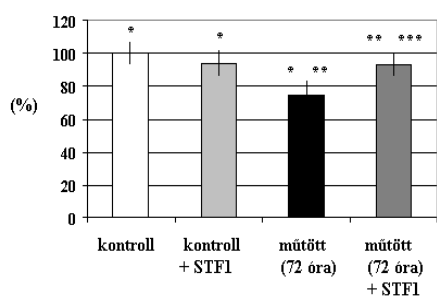
(3H/HeJ egér thymocyta proliferáció)



Minimális csökkenést tapasztaltunk a máj tömeg/testtömeg arány megmérésekor a kontroll és az operáción átesett antioxidáns-sal kezelt állatok között (49. ábra). Az antioxidáns-kezelés műtött állatoknál szignifikánsan növelte a máj tömeget.

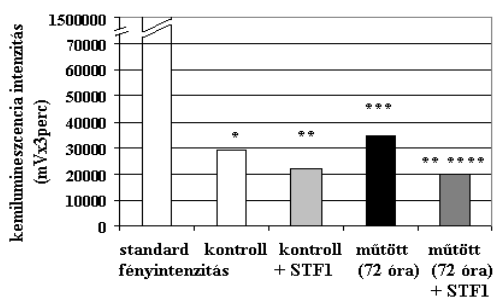
49. ábra

Sempervivum tectorum-kivonat hatása a májtömeg/testtömeg alakulására partiális hepatectomiában



50. ábra

Sempervivum tectorum-kivonat hatása partiális hepatectomiában a máj redox-homeosztázisára



A 49.-51. ábrákon a különböző számú *-gal jelölt értékek között $p < 0,05$ valószínűségi szintnél szignifikáns különbség van.

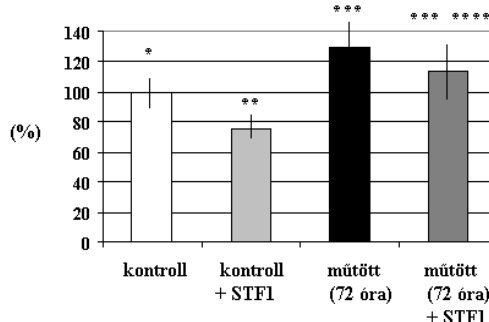
Következtetések

A celluláris immunfunkciók a műtétet követően jelentős mértékben megváltoztak. A spontán TNF- α -aktivitás depresszálódott, és a gyulladásos citokinek közül az IL-1 koncentrációja megnőtt. Ha LPS-sel stimuláltuk a lépmakrofágokat, akkor a TNF- α -aktivitás kissé növekedett, és az IL-1-aktivitás szignifikánsan megnőtt. A STF1-kivonat antioxidánsai a LPS-sel kiváltott TNF- α -aktivitást szignifikáns mértékben felerősítették, és az IL-1-aktivitást is fokozták a partiális hepatectomiát követő 72. órára. Fokozódott a Con-A-val stimulált sejtek blasztos transzformációja is, ami azt jelenti, hogy a készítmény hatóanyagai szignifikáns módon javították az immunreaktivitást. Ebben a folyamatban a készítmény direkt és indirekt antioxidáns tulajdonsága is megnyilvánulhatott, amit a kemilumineszcencia szignifikáns és a diénkonjugátum-koncentráció enyhe csökkenése bizonyított. A direkt antioxidáns hatást irodalmi adatok alapján feltételeztük, mivel a flavonoid aglikonok, illetve az egyszerű fenolsavak közvetlenül is felszívódhatnak a vékonybélből és a kvercetin részleges abszorpciója is megvalósulhat a terminális ileumban (Manach 1997, Hollman 1997, Lugasi 2000, Okuyama 1991).

A kemilumineszcenciás intenzitás $H_2O_2/\cdot OH$ -luminol rendszerben mind a kontroll, mind a műtött állatok esetében a STF1-kezelésre kisebb volt, mint a nem kezeltékben. A műtét fokozta a szabadgyökös reakciók erősségét. A diénkonjugátum-tartalom szignifikánsan nagyobb volt a műtött állatokban (50., 51. ábrák). A (49.-51. ábrákon a konfidenciahatárokat tüntettem fel.

51. ábra

Sempervivum tectorum-kivonat hatása a diénkonjugátum-koncentrációra partiális hepatectomiában



4.2.3. Antioxidánsok hatása a bél redox-homeosztázisára

A lamina propria és a submucosa az intestinum falának olyan rétegei, amelyek az epithelium és a muscularis mucosa között helyezkednek el. Sajátságos tulajdonságuk, hogy bennük foglal helyet a bél toknélküli immunrendszere. Számos sejttípus található a lamina propriában. E sejtek interakciója biztosítja a védelmet a táplálék útján szervezetbe kerülő antigénekkal szemben. Ezek a sejtek folyamatosan aktiválódnak, migrálnak és rész vesznek a „homing”-ban, hogy minél jobban biztosítsák környezetük védelmét. Ebben a „folytonos aktivitásban” a szabad gyökök jelentősége döntő. A bélrendszer redox-homeosztázisának biztosítása az antioxidáns védelem minden szintjén (funkciós csoportok, vitaminok, enzimek) megvalósul. A természetes immunitás, mely ellenanyagtermeléstől független, ugyanúgy fontos szerepet játszik a bél integritásának és funkciójának fenntartásában, mint az adaptív, vagy ellenanyagtermelő immunválasz. A természetes és adaptív immunrendszer összefonódása eredményezi az immun-homeosztázist. Az immun-homeosztázis feltételezi a redox-homeosztázis létét, mert a reakcióutakban keletkező szabad gyökök és az azokkal szemben kialakuló antioxidáns védelem biztosítja a bélben zajló folyamatok zavartalanságát. A zsírdús táplálkozás modulálja a bél nyirokrendszere sejteinek kommunikációját ugyanúgy, mint a májszövet vagy a lép makrofágjait, azáltal, hogy a kapcsolatot fenntartó citokinek termelését és release-t befolyásolja (Blázovics 2003, 2004a).

A természetes eredetű polifenolos vegyületek, ezen belül a flavonoidok abszorpciója alapvetően kémiai szerkezetüktől függ. A természetes táplálkozás során a polifenolos vegyületek nagy száma miatt nehézkes az antioxidáns készítmények felszívódás-vizsgálata. Annak érdekében, hogy képet kapjunk az antioxidáns terápia hasznosságáról, olyan, úgynevezett „globális” módszereket kellett alkalmaznunk, amelyek alkalmasak arra, hogy a polifenolos vegyületek szövetben megjelenő hatását tanulmányozzuk (Kocsis 2004, 2004a).

Célkitűzés

A kutatások első részében arra szerettünk volna választ kapni, hogy hogyan befolyásolja a zsírdús diéta és az alkoholfogyasztás, valamint a STF1-kivonattal történő kezelés a bélnyálkahártya integritását. A második részben pedig az érdekelt bennünket, hogy hogyan változik a bél redox-homeosztázisa antioxidáns kezelés hatására kísérletes hyperlipidaemiában.

Kísérleti körülmények

Az elvégzett kísérletek között 10 év telt el. A kísérletek során négy csoportot (10-10 állattal) képeztünk az előző fejezetekben leírt módon, melyben normolipidaemiás és hyperlipidaemiás állatcsoportokat kezeltünk megfelelő kontrollok mellett antioxidáns készítménnyel. Az első kísérletben az állatokat standardizált zsírdús diétával 9 napig etettük és ad libitum párhuzamosan

STF1-tal (napi 200 mg/ttkg) kezeltük, melyet 3 % alkoholt is tartalmazó itatólében adtunk. Ebből a kísérletből származnak a mikroszkópos felvételek. Az állatokat éter-narcosisban dekapitáltuk. Az állatokat a LATI-tól szereztük be.

A második kísérletben összesen 40 Wistar (150-200g) patkányt vizsgáltunk. Az állatokat a Charles River Hungary Kft-től szereztük be. Az állatok etetése és kezelése a hyperlipidaemia modellnél leírt módszerrel egyezett. A STF1-tal (2g/ttkg) történő per os kezelés 10 napig tartott ad libitum. Ebben a kísérletben nem adtunk alkoholt. Az állatok elaltatása 55 mg/ttkg ip. pentobarbitállal történt.

A szövettani vizsgálatokhoz a jejunumból vettünk mintát. A kis béldarabokat 4 %-os formalinban konzerváltuk, majd hematoxin–eozin-festés után vizsgáltuk (Fehér 1993).

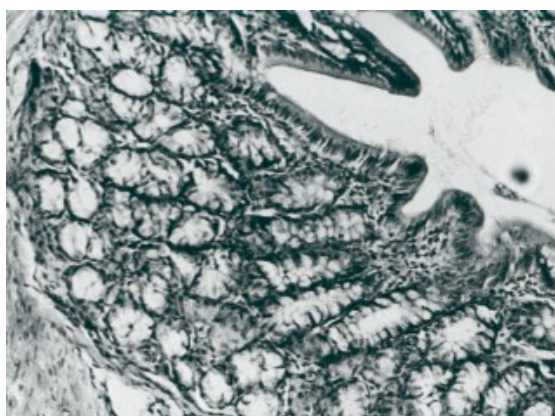
A mucosa (duodenum, jejunum, ileum, coecum, colon, rectum), preparálása a következőképpen történt: A jéghideg izotóniás NaCl-oldattal tisztára mosott elkülönített bélszakaszokból tompa élű késsel óvatosan kinyomtuk a mucosát mikroszkópos ellenőrzés mellett (Blázovics 2003). Az összegyűjtött mintákból 10 mg/ml fehérjetartalmú homogenizátumokat készítettünk. A fehérje-koncentráció meghatározását Lowry szerint végeztük (1951).

A szöveti H-donor-aktivitást DPPH jelenlétében mértük (Blois 1958). A redukálóképesség meghatározását Oyaizu szerint végeztük (1986). A mucosa-homogenizátum stimulált kemilumineszcenciás intenzitásának meghatározása Blázovics (1999a) módszerének módosításával történt. A mucosa-szuszpenzióból 60 µl –t mértünk a vizsgáló rendszerhez.

Eredmények

A STF1 képes a bélbolyhokat is megvédeni a zsírdús táp és az alkohol káros hatásától.

52A. ábra Egészséges jejunum



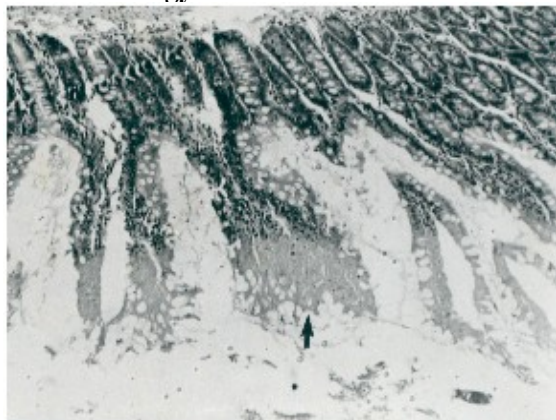
Az 52A., 52B. és 52C. ábrák mutatják a jejunum szerkezetét egészséges állapotban, zsírdús táp + alkoholfogyasztás után és hyperlipidaemiás állatokban STF1-kezelést (napi 200 mg kivonat/ttkg/9 nap) követően (Fehér 1993).

A lipidekben gazdag táplálkozás és az alkoholfogyasztás következtében a bélmucosa jelentősen károsodott, oedemás és ulceratív képet mutatott. A diffúz, felszíni epitheliális károsodás mértéke gyakran a mucosa 80 %-ára is kiterjedt. Számos

esetben leukocitainfiltráció volt megfigyelhető. A Lieberkühn-kripták épek maradtak. A STF1 védelmet biztosított az alimentáris eredetű károsodásokkal szemben, így csak néhány helyen, a villusok csúcsán volt látható sérülés. Egy-egy zsírcseppet figyeltünk meg a bolyhokban (52B., 52C. ábrák).

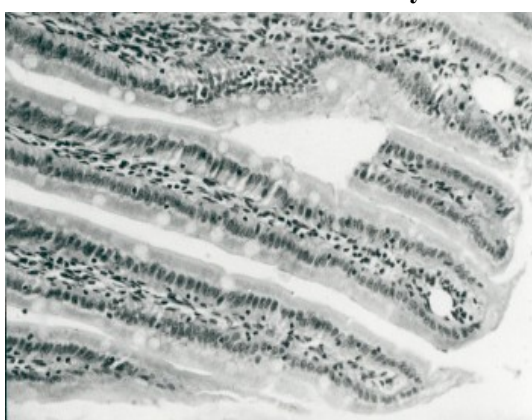
52B. ábra

Jejunum állapota zsírdús táp és alkoholfogyasztás következtében



52C. ábra

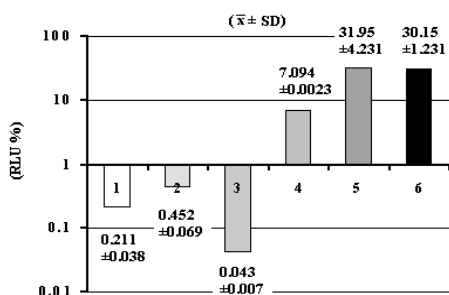
***Sempervivum tectorum*-kivonattal történő kezelés eredménye**



A kemilumineszcenciás vizsgálatok azt mutatták, hogy a bél különböző szakaszaiban eltérő az indukálható szabadgyökös reakciók szintje. Az egészséges normolipidaemiás állatok bélmucosa-homogenizátumaiban a szabadgyök-termelésben szignifikáns különbségeket kaptunk a vékony- és a vastagbél egyes szakaszai között. A hyperlipidaemiás állatok esetében még markánsabb különbségek jelentkeztek, ami egyrészt annak tudható be, hogy a bélben a zsírdús táp fogyasztása miatt gyulladásos folyamatok zajlottak, másrészt a bélhámsejtek abnormális lipidmennyisége miatt a lipidperoxidáció felerősödött. E hatások háttérében az antioxidáns védekező rendszer gyengülése is felelőssé tehető (Fehér 1993, Lelbach 1996). A hyperlipidaemiás állatokban a rectumban volt a legmagasabb a szabadgyök-szint. Itt a növekedés ~7,1-szer volt nagyobb, mint a kontrollokban (53.-55. ábrák).

53. ábra

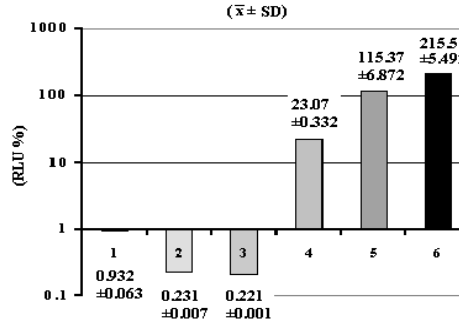
Kemilumineszcenciás intenzitás a vékony- és vastagbél-mucosa homogenizátumokban kontrollpatkányokban



1: duodenum, 2: jejunum, 3: ileum, 4: coecum, 5: colon, 6: rectum

54. ábra

Fokozott kemilumineszcenciás intenzitás a vékony és vastagbél-mucosa homogenizátumban, zsírdús tápon tartott patkányokban



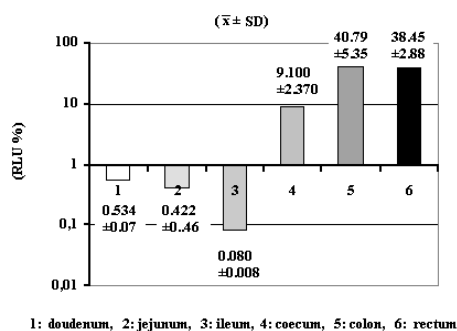
1: duodenum, 2: jejunum, 3: ileum, 4: coecum, 5: colon, 6: rectum

A hyperlipidaemiás állatcsoport SFT1-kivonat kezelése gyakorlatilag normalizálta a redox-homeosztázist a bélszakaszokban. Az 55. ábrából kitűnik, hogy az összes bélszakasz esetében közel azonos értékeket kaptunk, mint a normolipidaemiás állatoknál (53. ábra). A coecumban

kapott érték szignifikánsan kisebb a rectumban és colonban kapott értékeknél. Az 53.-61. ábrákban a konfidenciahatárokat tüntettem fel.

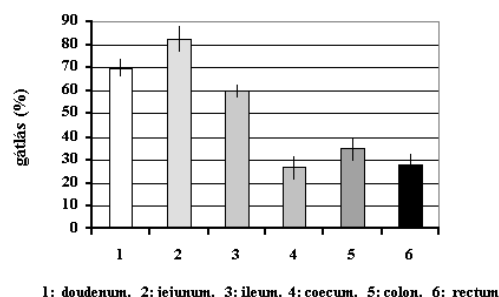
55. ábra

Kemilumineszcenciás intenzitás a vékony- és vastagbél mucosa homogenizátumokban zsírdús tápon tartott és STF1-kivonattal kezelt patkányokban



56. ábra

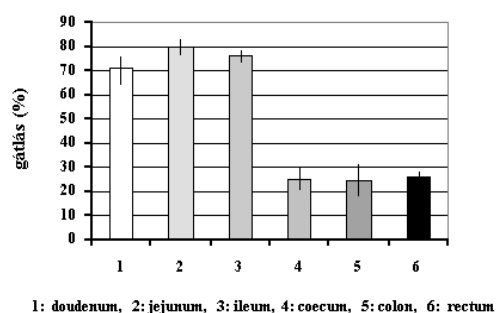
H-donor-aktivitás a bél egyes szakaszainak mucosa-homogenizátumában kontrolldiétát fogyasztó patkányokban



A szöveti antioxidáns státusz változását a H-donor-aktivitás és redukálóképesség vizsgálatokkal igazoltuk (56.-61. ábrák). A szabadgyök-szint kóros megnövekedése az egyes bélszakaszokban az antioxidáns védelem hiányosságának is a következménye. A H-donor-aktivitás és a redukálóképesség értékek szignifikánsan kisebbek voltak a vizsgált három utolsó bélszakaszban hyperlipidaemiában. E kedvezőtlen változás a STF1 adásával normalizálódott (58. és 61. ábra). E mérési eredmények jól korreláltak a kemilumineszcenciás vizsgálatok eredményeivel (Blázovics 2003).

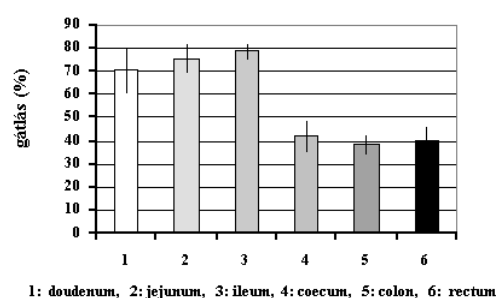
57. ábra

H-donor-aktivitás a bél egyes szakaszainak mucosa-homogenizátumában zsírdús diétát fogyasztó patkányokban



58. ábra

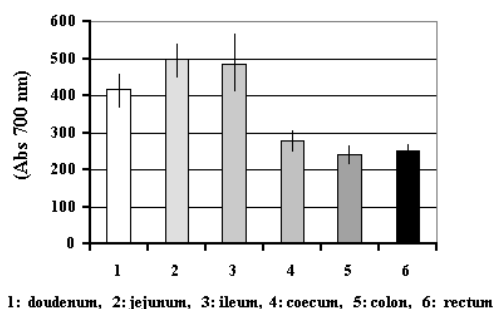
H-donor-aktivitás a bél egyes szakaszainak mucosa-homogenizátumában zsírdús tápon tartott és STF1-kivonattal kezelt patkányokban



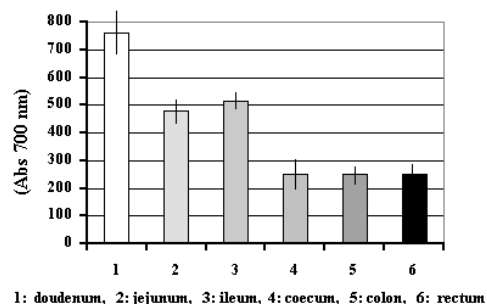
59. ábra

60. ábra

Redukálóképesség a bél egyes szakaszainak mucosa-homogenizátumában kontrolldiétát fogyasztó patkányokban

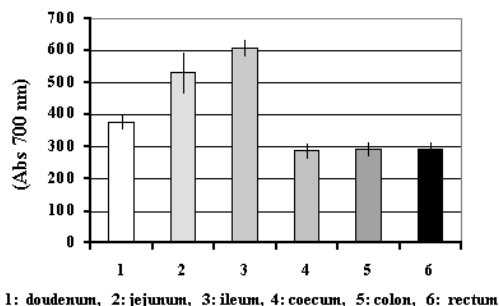


Redukálóképesség a bél egyes szakaszainak mucosa-homogenizátumában zsírdús diétát fogyasztó patkányokban



61. ábra

Redukálóképesség a bél egyes szakaszainak mucosa-homogenizátumában zsírdús diétát fogyasztó és STF1-kivonattal kezelt patkányokban



Következtetések

A redox-homeosztázis nagyon fontos a rák kifejlődése, az apoptózis, a nekrozis és a sejtregeneráció egyensúlyában. A mérsékelt energiabevitelű táplálkozás és a növényi eredetű élelmiszerek fogyasztása kedvező hatású a bél redoxi-egyensúlyára. Zsírdús diéta hatására megfigyelhető a bélhámsejtek nekrozisa (Blázovics 1993, 2002, 2004a, Fehér 1993). A bél három

felső szakasza, a duodenum, jejunum és ileum antioxidáns védelme intenzívebb, mint a caecum, colon és rectum szakaszoké, melynek oka a szerkezeti felépítés és az ebből adódó funkcióbeli különbség. A béltraktus redox-homeosztázisának tanulmányozására kifejlesztett vizsgálati módszereink alkalmasak voltak arra, hogy mind a szabadgyök-termelést, mind az antioxidáns kapacitást vizsgálni tudjuk. Kísérleteinkben igazoltuk, hogy a STF1 antioxidáns vegyületei felszívódnak a bélcsatornából. Ennek következtében képesek befolyásolni a bél redox-homeosztázisát.

4.3. Szabadgyök-reakciók máj- és hólyagepében állatkísérletekben és humán tanulmányokban

Az 1990-es években írtuk le először, hogy alimentáris eredetű steatosis hepatitisban a patkányok májában primer és szekunder szabadgyökös reakciók zajlanak le, amelyeket már a máj természetes antioxidáns védelmi mechanizmusai nem képesek visszaszorítani, így a természetes szabad gyök – antioxidáns egyensúly eltolódik és a szabadgyök-képződés kontrollálatlanná válva hozzájárul a gyors szöveti nekrozishoz (Blázovics 1988c, Blázovics 1992). Mivel a patológiás állapot jelentős mértékben befolyásolja az epetermelést, annak koleszterin/epesav,

koleszterin/foszfolipid arányát, a foszfolipidek telített és telítetlen zsírsavösszetételét, valamint az epe szekrécióját és magát az enterohepaticus cirkulációt, logikusan következett az a feltételezés, hogy a szabad gyökök lipidperoxidációs folyamatokat váltanak ki magában az epében is, és a reakciók az epehólyagban folytatódnak. Ezáltal megváltoztatják a hólyagepe konzisztenciáját, és a megváltozott reológiai viszonyok hozzájárulnak a koleszterinkövek gyors kialakulásához (Blázovics 1994,1995, 1997a,b,c.).

4.3.1. Lipidperoxidáció máj- és hólyagepében

Az 1980-as évek végére egy merőben új hipotézis látott napvilágot, mely alapján változtatta meg a koleszterinkő-képződés addigi konzervatív felfogását, vagyis azt az elképzelést, hogy a kőképződés a lipidmetabolizmus módosulásának, a májbetegségeket jellemző epekiválasztás zavarainak és az enterohepaticus körforgásban bekövetkező rendellenességeknek tulajdonítható (Canthafora 1981, Cohen 1985, Small 1970). Ez az új paradigma a hagyományos szemlélet lényeges megállapításait megtartva, fontosságot tulajdonított az epehólyagban zajló folyamatok kinetikájának, a reakciók termodinamikai sajátosságainak és az epehólyag motilitásának (Admirand 1968, Fisher 1982, Friedhandler 1983, Gallinger 1984, Groen 1988, Holan 1979). Felfigyelve Dam és munkatársai (1971) vizsgálataira, alapvető szerepet tulajdonítottak az epehólyag falában zajló biokémiai folyamatoknak, melyek eredménye a proszttaglandinok megjelenése az epében és a mucin hiperszekréciója (Carey 1988, Lee 1981, Levy 1984, Li 1986, van Berge Henegouven 1987).

Állatkísérletek alapján feltételezhető volt, hogy a palmitoil (16:0) - arachidonil (20:4) – lecitin abszorbeálódik az abnormális összetételű epéből a hólyagfal membránjába, ahol a specifikus foszfolipáz A₂ epesavak és Ca²⁺-ionok jelenlétében aktiválódik. Az enzim a lecitint lebontja és az arachidonsavat szabaddá teszi, mely a ciklooxygenáz szubsztrátjaként beindítja a proszttaglandin-bioszintézislánc működését. A szoros kapcsolat az arachidonsavkaskád működése és a mucinkiválasztás fokozódása között bizonyítható volt azzal, hogy a mucin hiperszekréciója a ciklooxygenáz-inhibitor aszpirin jelenlétében gátlódott (Carey 1978, 1988, 1988a, LaMont 1983, LaMorte1986, Lee 1981, 1981a). Tehát e reakciók, valamint a motilitás csökkenése, a koleszterin-szupersaturáció és a nukleáció együttesen járulnak hozzá az epekőképződéshez.

Korai kutatásaink során azt is feltételeztük, hogy a szabad gyökök az epehólyag falában a steril gyulladás során beinduló arachidonsavkaskádban képződhetnek, vagy a bél felől érkező bakteriális eredetű fertőzés következtében a respiratory burst alatt keletkeznek (Abdel Rahman 1996, Blázovics 1998). E hipotézisünk igazolására végzett kutatásaink megerősítették a szabad

gyökök patogenetikai szerepét epeköbetegségekben (Abdel Rahman 1996, Blázovics 1997, Sípos 1997, 2001, 2001a).

Célkitűzés

Mivel kellő számú és meggyőző bizonyíték állt rendelkezésünkre abban a tekintetben, hogy a szabad gyököket, mint patogenetikai tényezőt nem lehet kizárni az epebetegségekben, és szövődményeiben, igazolni kívántuk hogy a zsírmájból is szekretálódik szabadgyök-prekursor molekula, amely hozzájárulhat az epeköképződéshez.

Kísérleti körülmények

Állatkísérletes és humán vizsgálatokat végeztünk a kérdés eldöntésére. Etikai megfontolásból egészséges humán hólyagepéből nyert epével nem dolgoztunk.

1. Vizsgálatainkat Wistar albino patkányokon végeztük. Az állatokat két, egyenként 10-10 állatból álló csoportra osztottuk. A kontrollcsoport normál LATI tápot, a kezelt csoport LATI táphoz adott 2 % koleszterint, 20 % napraforgóolajat és 0,5 % kólsavat tartalmazó tápot fogyasztott (Blázovics 1992). A 9 napig tartó diéta után az állatokat 1g/ttkg dózisú urethannal ip. kezelve mély narkózisban megműtöttük. A laparotomiát követően a ductus choledochust kanuláltuk és 2 órán keresztül gyűjtöttük az elfolyó epét. Az állatokat végezetiül dekapitáltuk és a kivérzett májból további izotóniás KCl-os mosással eltávolítottuk a maradék vért. A májból szövetnedves homogenizátumot készítettünk.

2. A cholecystectomián átesett betegek (n=19) epehólyagjából fecskendővel epeváladékot gyűjtöttünk, melyeket az állatkísérletekben kapott mintákhoz hasonlóan a legrövidebb idő alatt igyekeztünk feldolgozni.

Eredmények

A 21. táblázatban a kontroll és az alimentáris eredetű steatosis hepatitisban szenvedő állatok májának zsírsavösszetételét adtuk meg. Az adatok jelzik, hogy a diétát terhelő káros mennyiségű olajsav és linolsav (mely a napraforgóolajból származott) feldúsult a májban, míg a 20:4-es arachidonsav és a többi C22 szénatomszámú többszörösen telítetlen zsírsavak aránya szignifikánsan csökkent a beteg állatok májszövetében.

A májepe zsírsavösszetételét vizsgálva megállapítható volt, hogy kísérletes zsírmájban jelentősen több, mintegy tízszeresére nőtt az arachidonsav, közel háromszorosára az eikozatriénsav és másfélszeresére a linolsav, azaz a többszörösen telítetlen zsírsavak aránya (22. táblázat). A májhomogenizátumok és epeváladékok zsírsavösszetételét gázkromatográfiás technikával határoztuk meg. A lángionizációs detektorral ellátott Hewlett-Packard gázkromatográfon végzett elválasztás paramétereit a 21. és 23. táblázatok után tüntettem fel.

21. táblázat

Zsírsavösszetétel kontroll- és zsírmájban, patkányokban			
zsírsav		kontrollmáj (% ± SEM)	zsírmáj (% ± SEM)
C14:0	mirisztinsav	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1
C15:1	pentadekánolajsav	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1
C16:0	palmitinsav	16,2 ± 1,3	7,2 ± 0,4
C16:1	palmitolajsav	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,3
C17:0	margarinsav	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1
C18:0	sztearinsav	16,9 ± 0,6	4,8 ± 0,4
C18:1	olajsav	10,9 ± 0,6	22,7 ± 1,6
C18:2	linolsav	21,9 ± 1,5	45,9 ± 2,2
C20:0	arachinsav	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1
C18:3	linolénsav	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
C20:1	gadolénsav	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
C20:2	eikozadiénsav	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1
C20:4	arachidonsav	20,9 ± 0,2	7,2 ± 0,5
C22:0	behénsav	0,9 ± 0,1	3,0 ± 0,2
C22:5	ω 6	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
C22:5	ω 3	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,1
C22:6	dokozahexaénsav	3,9 ± 0,5	1,0 ± 0,2
C24:0	lignocerinsav	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,3

Mérési körülmények: Hewlett–Packard 5890 gázkromatográf

kolonna: SP2340 silica (60 m x 0,32 mm; 0,25 µm filmvastagság), hőmérséklet: kolonna: 180 °C, injektor: 220 °C, detektor: 220 °C, injektor: split split ratio 1:100, karriergáz: hidrogén 1,5 cm³/min, detektorgáz: hidrogén 30,0 cm³/min, levegő: 400,0 cm³/min, nitrogén: 30,0 cm³/min

22. táblázat

Zsírsavösszetétel a májepében kontroll- és zsírmájban, patkányokban			
zsírsav		kontrollmáj (% ± SEM)	zsírmáj (% ± SEM)
C12:0	laurinsav	1,45 ± 0,55	0,26 ± 0,04
C14:0	mirisztinsav	2,14 ± 0,29	3,34 ± 2,91
C15:1	pentadekánolajsav	0,88 ± 0,75	1,47 ± 0,65
C16:0	palmitinsav	21,09 ± 2,06	19,58 ± 0,44
C16:1	palmitolajsav	0,70 ± 0,63	4,02 ± 3,35
C18:0	sztearinsav	21,53 ± 4,17	8,10 ± 3,48
C18:1	olajsav	34,96 ± 3,26	23,29 ± 8,71
C18:2	linolsav	10,52 ± 2,36	17,54 ± 3,33
C18:3; C19:0;	linolénsav	1,99 ± 0,34	1,87 ± 0,69
C20:0	arachinsav	0,54 ± 0,18	6,22 ± 0,68
C20:2	eikozadiénsav	1,70 ± 0,87	3,01 ± 0,17
C20:3	eikozatriénsav	0,63 ± 0,00	2,04 ± 0,85

Mérési körülmények: Hewlett–Packard 5890 gázkromatográf

kolonna: Carbowax 20M (25 m x 0,2 mm; 0,25 µm filmvastagság), hőmérséklet: kolonna: 180 °C, injektor: 280 °C, detektor: 205 °C, injektor: split split ratio 1:50, karriergáz: nitrogén 0,3 cm³/min, detektorgáz: hidrogén 30,0 cm³/min, levegő: 400,0 cm³/min, nitrogén: 30,0 cm³/min

A humán vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy mind az egyszeresen, mind a kétszeresen és többszörösen telítetlen zsírsavak is kimutathatók a hólyagepében (23. táblázat).

23. táblázat

Zsírsvösszetétel humán hólyagepében cholecystitis chronicával társult epekövességben		
zsírsav		hólyagepe (% ± SEM) (N=17)
C14:0	mirisztinsav	1,79 ± 0,64
C16:0	palmitinsav	15,90 ± 1,46
C16:1	palmitolajsav	10,54 ± 1,56
C18:0	sztearinsav	7,38 ± 1,18
C18:1	olajsav	28,05 ± 32,19
C18:2	linolsav	28,05 ± 1,15
C20:0	arachinsav	2,51 ± 0,80
C20:4	arachidonsav	6,07 ± 0,89

Mérési körülmények: Hewlett–Packard 5890 gázkromatográf

kolonna: Carbowax 20M (25 m x 0,2 mm; 0,25 µm filmvastagság), hőmérséklet: kolonna: 180 °C, injektor: 280 °C, detektor: 205 °C, injektor: split split ratio 1:50, karriergáz: nitrogén 0,3 cm³/min, detektorgáz: hidrogén 30,0 cm³/min, levegő: 400,0 cm³/min, nitrogén: 30,0 cm³/min

A 19 betegből 17 esetben fordult elő cholecystitis chronica és két esetben cholangitis, amely egyik betegnél choledocholithiasis, másiknál gangraenás cholecystitis talaján alakult ki. Egy esetben epekő nélküli dyskinesia cholecystát diagnosztizáltunk. További vizsgálatainkat a 18 epeköves betegből végeztük.

A következő 24. táblázatban a betegek epéjéből mért lipidperoxidációs termékek koncentrációi láthatók.

24. táblázat.

Humán hólyagepe lipidperoxidációs termékei	
lipidperoxidációs termékek	epeköves betegek (n=18) (átlag ± szórás)
diénkonjugátum (Abs./ml)	4,72 ± 0,75
oxidált lipidek (µg/ml)	341,91 ± 77,93
malondialdehid (nmol/ml)*	209,25 ± 18,90
* (n=17) egy esetben extrém magas értéket mértünk.	

Az oxidált lipidek kimutatása vékonyréteg-kromatográfiásan történt (lásd 3.6.5. fejezetet).

E lipidperoxidációs termékek igazolták, hogy az epehólyagban folytatódtak az oxidatív folyamatok, melyek az epekőbetegség kialakulásához döntő mértékben hozzájárulhattak.

A kapott eredmények alapján felmerült az a kérdés, hogyan lehetséges, hogy egy oxigénnel kevésbé ellátott szerv, az epehólyag, melynek fő antioxidáns vegyülete a bilirubin, tartalmazza a lipidperoxidációs láncreakciók termékeit. A kísérletek folytatását a 4.3.2. fejezetben tárgyalom. (Blázovics 1997a).

Következtetések

A máj zsíros degenerációja miatt jelentősen megváltozik a májepe zsírsavösszetétele. Kísérletes zsírmájban a telítetlen és többszörösen telítetlen zsírsavak koncentrációja megnő a májepében. Humán vizsgálatainkban a 19 epeköves beteg mindegyike túlsúlyos volt, ezért feltételezhető, hogy epéjük telítetlen zsírsavtartalma, hasonlóan a zsírmájban szenvedő patkányokhoz a májfunkciók eltérésének következménye.

4.3.2. A bilirubin ambivalens viselkedése

A bilirubin antioxidáns és prooxidáns tulajdonságával foglalkozó irodalmi ismereteinket a 2.5. fejezetben írtam le (Bacci 1989, Blázovics 1994, Stocker 1987, 1989). Itt néhány fontos adattal szeretném megerősíteni a bilirubinnal kapcsolatos további kutatásaink okát.

Az epekövek összetételét analizálva a kövek 75-85 %-át a tisztán koleszterint tartalmazó kövek, illetve a kevert barnakövek, míg 15-25 %-át a pigment vagy bilirubinkövek adják. Az összes kőtípus 25-35 %-a kalcifikált (Cohen 1985, Lee 1986).

Az ember naponta 800-1500 ml epét termel, mely normális összetétel esetén 80 % vizet és 20 % oldott anyagot tartalmaz. Ez utóbbi 20 %, 65 %-a epesav, 20 %-a foszfolipid, 4-5 %-a a plazmából származó fehérje, 4 %-a koleszterin és 0,3 %-a konjugált bilirubin. A hátralévő néhány %-ot a fém sók és a vitaminok, valamint azonosíthatatlan anyagok teszik ki (Cohen 1985).

Célkitűzés

Ebben a kísérletben arra szerettünk volna választ kapni, vajon milyen kapcsolat található a humán hólyagepe lipidperoxidációs termékei és a bilirubin koncentrációja között. Ki tudjuk-e mutatni a hólyagepében a szabad bilirubint? Tudjuk-e igazolni a szabad bilirubin prooxidáns tulajdonságát humán hólyagepében?

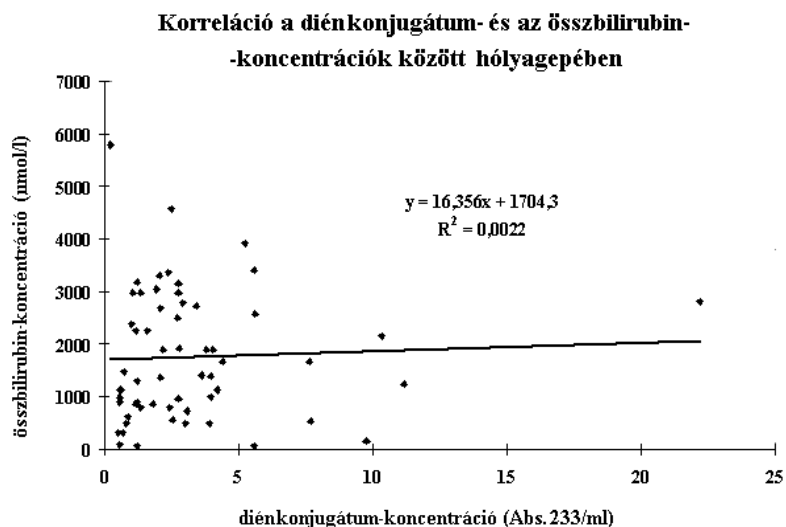
Kísérleti körülmények

A 3.2.1. fejezetben leírt módszer szerint gyűjtött epemintából dolgoztunk. A „Módszerek” 3.12. pontja alatt leírtak szerint HPLC-vel határoztuk meg a szabad bilirubin és bilirubinszármazék molekulákat.

Eredmények

A 62. ábrán feltüntetett diénkonjugátum- és összbilirubin-koncentrációk között nem találtunk korrelációt. Ennek több magyarázata lehet. Az egyik, és talán legfontosabb, hogy a diénkonjugátumok nem stabil molekulák, hanem a lipidperoxidáció során tovább oxidálódnak, és így nem lehet pontosan meghatározni a koncentrációjukat, főleg, ha az epében vér is van, mert a hemoglobin Fe-tartalma felgyorsítja a lipidek oxidatív degradációját. Zavaró tényező az epe egyéb fémiontartalma is (Szentmihályi 2002, Sípó 2003). További ok lehet a szabad bilirubin és a telítetlen zsírsavak együttes kőalkotó reakciója, ugyanis az epében jelenlévő Ca^{++} -ionok a

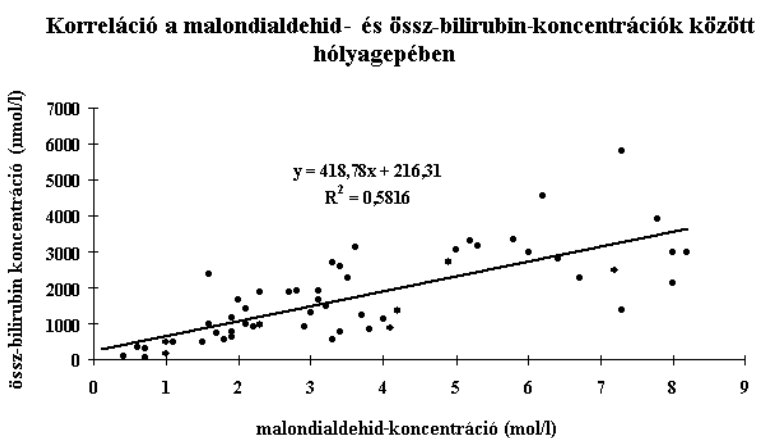
62. ábra



komponensek (Bonett 1976, Chowdhury 1983, Bayes Garsia 1989, Trotman 1985).

63. ábra

A malondialdehyd- és a bilirubinkoncentráció között gyenge korrelációt kaptunk, amit a 63. ábra mutat. A MDA-koncentráció meghatározását Pyles és mtsai (1993) szerint végeztük, így a bilirubin- és a



hemoglobintartalom nem zavarta a mérést. Eszerint nagy összbilirubin-koncentráció mellett is folyik a lipidek peroxidációja. A lineáris regressziós analízis szerint, ha a hólyagepében kis összbilirubin-koncentráció volt, kb. 200-800 $\mu\text{mol/l}$, akkor a kemilumineszcenciás fényintenzitás úgy változott a bilirubin koncentrációjától függően, hogy a kisebb koncentrációs értékeknél az alaprendszer fényintenzitásánál másfélszer, kétszer erősebb intenzitást mértünk a H_2O_2 -ot és luminolt tartalmazó rendszerben. Ebből arra lehetett következtetni, hogy a bilirubin koncentrációtól függően prooxidáns tulajdonságú. Az 1000 μmol , és ettől nagyobb bilirubin-koncentrációk befogták a $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}$ -gyököt és így a luminol $\rightarrow$ aminoftalát reakció gátlódott.

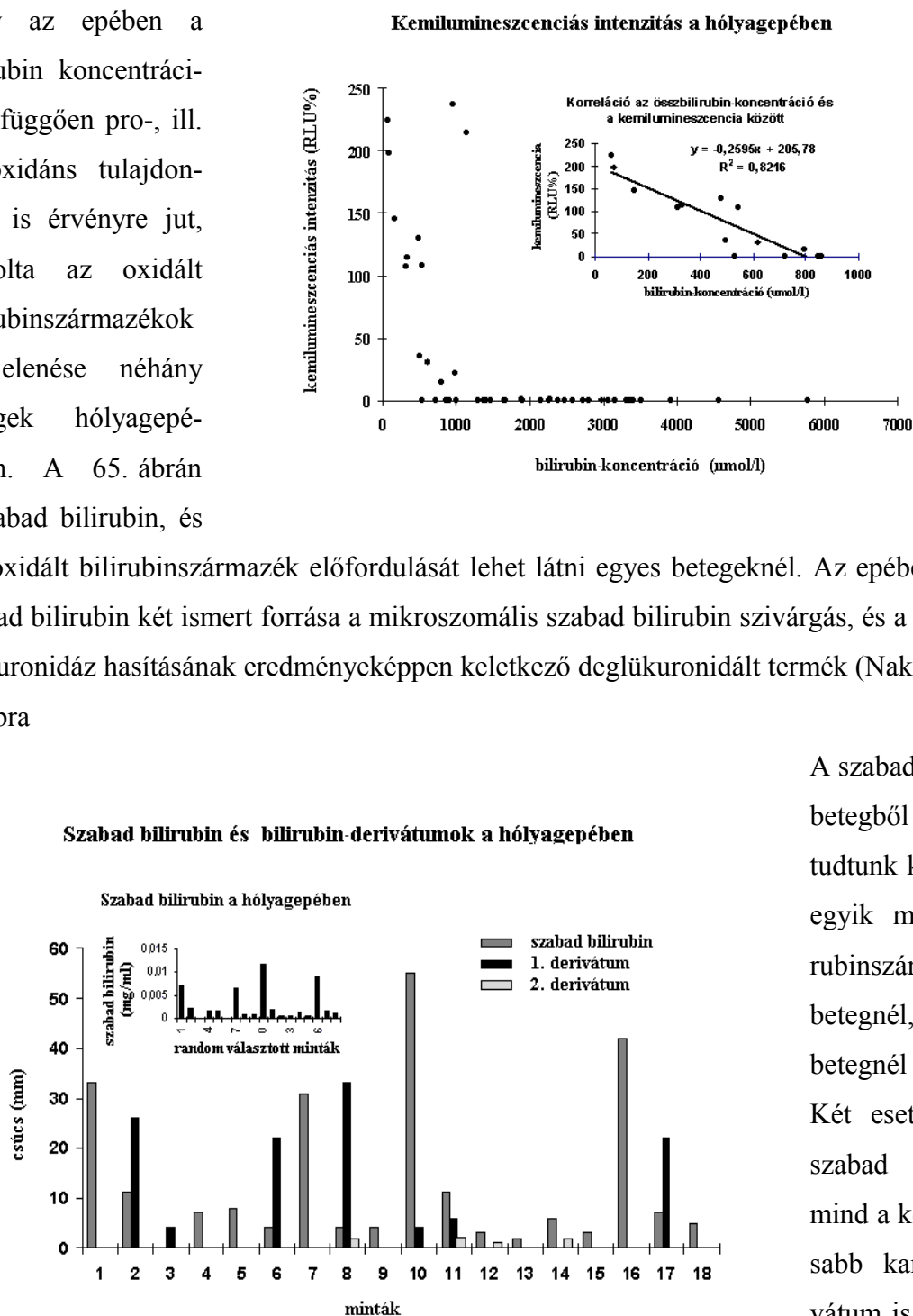
szabad bilirubinnal kalcium - (hidrogén) -bilirubinát formájában kicsapódnak. A Ca^{++} a zsírsavakkal is képes reakcióba lépni, és ezzel meg tudja változtatni az epe viszkozitását. A lipidek, a szabad bilirubin és a fémionok együttesen kőalkotó

64. ábra

Azt a feltevésünket, hogy az epében a bilirubin koncentrációtól függően pro-, ill. antioxidáns tulajdonsága is érvényre jut, igazolta az oxidált bilirubinszármazékok megjelenése néhány betegek hólyagepében. A 65. ábrán a szabad bilirubin, és

két oxidált bilirubinszármazék előfordulását lehet látni egyes betegeknél. Az epében megjelenő szabad bilirubin két ismert forrása a mikroszomális szabad bilirubin szivárgás, és a bakteriális β -glükuronidáz hasításának eredményeképpen keletkező deglükuronidált termék (Nakao1988).

65. ábra

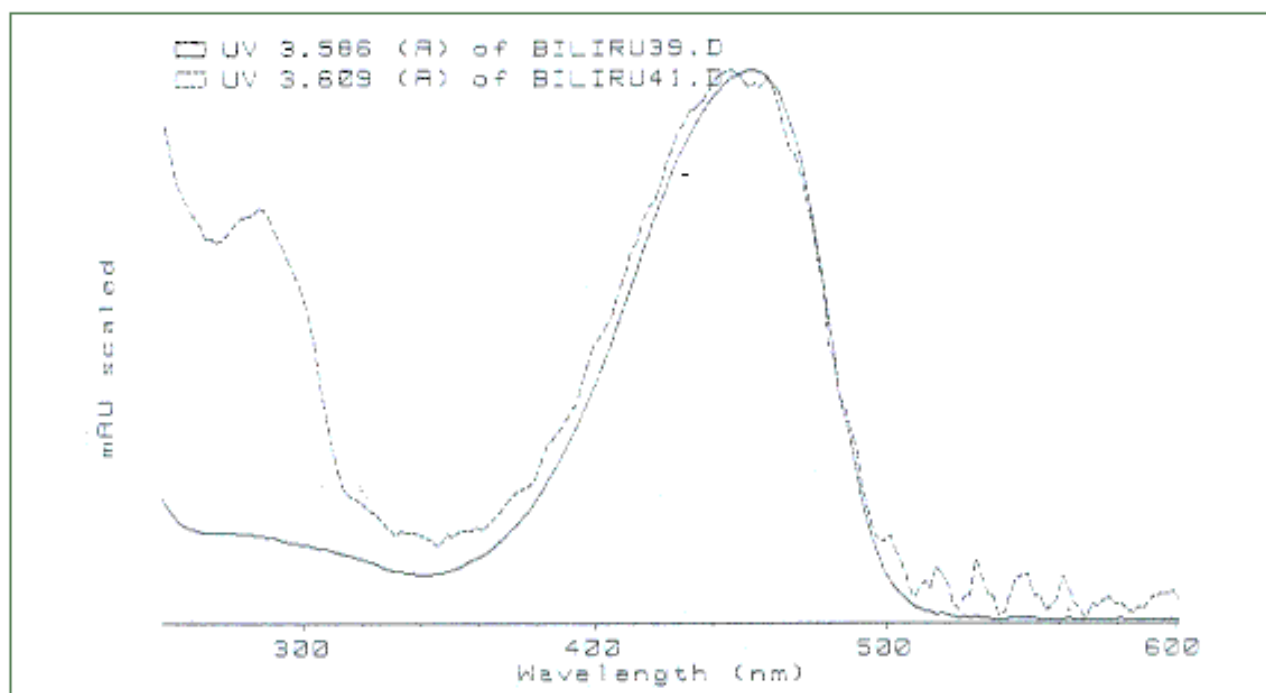


A szabad bilirubint 18 betegből 17 esetében tudtunk kimutatni. Az egyik módosult bilirubinszármazékot 8 betegnél, a másikat 4 betegnél detektáltuk. Két esetben mind a szabad bilirubin, mind a kétféle polárosabb karakterű derivátum is jelen volt az epében.

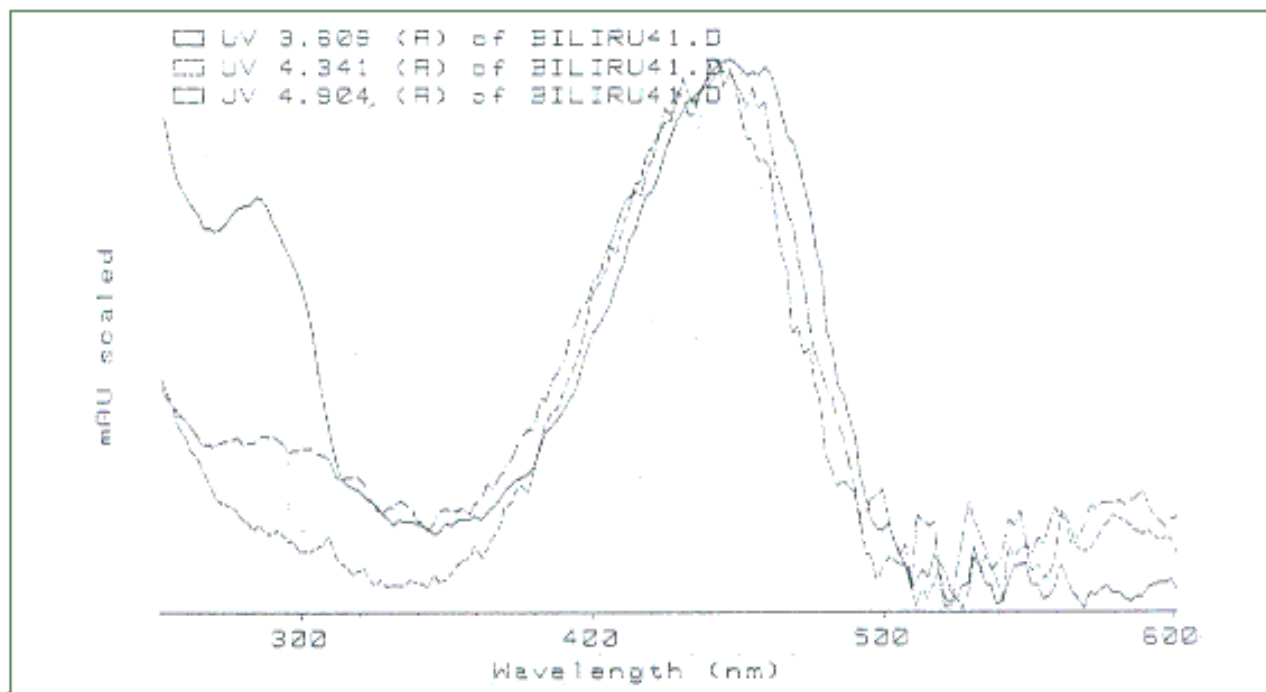
A HPLC-analízis és az on line UV-spektrum jelezte a szabad bilirubin és két polárosabb bilirubinszármazék jelenlétét a humán hólyagepében (66A., 66B. és 67A., 67B. ábrák).

66A. és 66B. ábrák

Bilirubin-standard és emberi epéből származó azonos retenciós idővel eluálódó szabad bilirubin on-line UV-spektruma

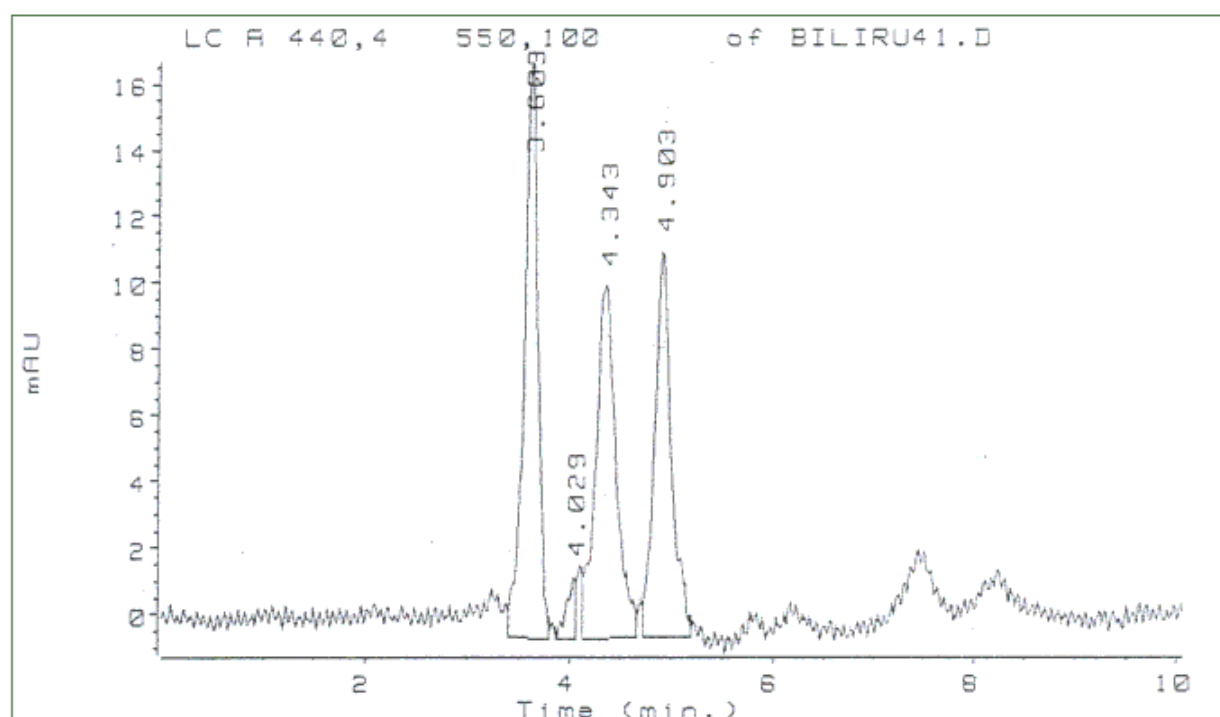
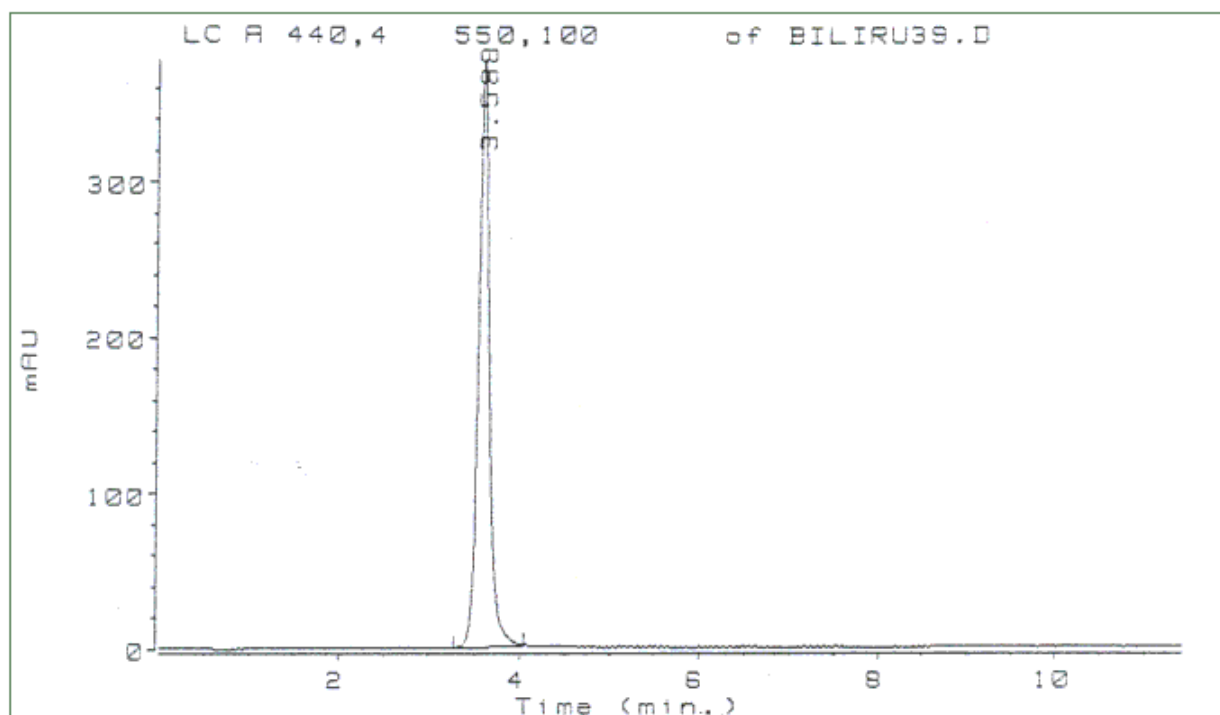


Emberi epéből származó három bilirubin-származék on-line UV-spektruma



67A. és 67B. ábrák

Bilirubin-standard és emberi epéből izolált bilirubin HPLC kromatogramja 440 nm-en



4.4. Tesztrendszer kidolgozása a redox-homeosztázis tanulmányozására

különböző betegségekben

Az utóbbi évek kutatásai bebizonyították, hogy a szabadgyök-folyamatok az életműködéshez nélkülözhetetlenek. A szabad gyökök túlermelődése azonban jelentősen terheli a szervezetet és előbb-utóbb az antioxidáns védelmi mechanizmus kimerül. A szabad gyökök in situ vizsgálata az orvosi gyakorlatban jelenleg nem létezik. A szabadgyökös folyamatokban keletkező „fingerprint molekulák”, ill. az antioxidáns védekező mechanizmus elemeinek koncentrációja és/vagy aktivitása vizsgálható. Az egészséges szervezet szabad gyök - antioxidáns egyensúlya miatt gyakorlatilag a szabad gyökök károsító hatása nem mutatható ki. Betegségekben azonban számos oxidatív károsodást szenvedett molekula jelenik meg a sejtekben, szövetekben, vérben és a vizeletben. Az antioxidáns védelmi mechanizmus egymásra épülő elemei szintén károsodnak, ill. kiürülnek a szervezetből.

A kompartmentek, sejtek, szövetek antioxidáns védekező rendszere nem azonos. A funkciónak megfelelően jelentős eltérések találhatók. A beteg szervtől távolabb eső szövetek antioxidáns státusza eltérő. Hosszan tartó betegség következtében azonban a szervezet egésze károsodik.

A 90-es évek szabadgyök-kutatásainak egyik irányzata azt a célt tűzte ki, hogy a klinikai vizsgálatok között szerepeljenek a szabadgyökös ártalmakat kimutató diagnosztikai célokra alkalmas kitek. Ilyen kiteket forgalmaz a RANDOX és OXIS cég. E kitekkel történő mérés azonban még nem általános, mivel több paraméter együttes meghatározása ad csak kielégítő választ a betegség stádiumára és a kezelés hasznosságára vonatkozóan. Sok esetben a kitek ára szabja meg a határt ahhoz, hogy a vizsgálatokat elvégezhessük (Kocsis 2003).

Célkitűzés

Számos módszert alkalmaznak a szabad gyökök és az antioxidánsok mérésére, de egy-egy kiragadott módszerrel kapott eredmény gyakorlatilag nem informatív, sok esetben ellentmondó. Humán vizsgálatokban számos gyógyszer és élvezeti anyag, valamint a betegek rossz compliance-e zavarja a vizsgálatokat. Sok paraméter egyidejű rutinszerű meghatározása pedig etikai és anyagi okokból kivitelezhetetlen.

1. Munkacsoportunk ezért olyan olcsó, rutinvizsgálatokra is alkalmas kemilumineszcenciás vizsgálati módszer kifejlesztését tervezte, amely egyidejűleg képes a szabad gyökök és az antioxidánsok meghatározására szöveti mintákból.
2. A módszernek működnie kell antioxidáns gyógyszer fogyasztása mellett is, megfelelő információt adva a betegek redox-homeosztázisáról.
3. A módszer kidolgozásánál azt is figyelembe kellett venni, hogy a betegeket ne terhelje a vizsgálat, és ne szenvedjenek semmilyen károsodást. Lehetőleg a klinikai ellenőrző laboratóriumi vizsgálatokhoz kapcsoltan vérplazmából és vörösvértestekből történjenek a meghatározások néhány ml térfogatú vér felhasználásával.

4. A kapott eredmények prognosztikusak legyenek, jól jelezzék a kezelés hatékonyságát és a betegség stádiumát.
5. Ezzel a módszerrel egyszerre több vizsgálat is kiváltható legyen.

Kísérleti körülmények

A vörösvértest és a plazma redoxistátuszát 1996 és 2004 között, megközelítően 1500 ember (25 - 60 év) esetében határoztuk meg, akik különböző gastrointestinalis betegségben, alkoholos májbetegségben, nem alkoholos májbetegségben, gyulladásos bélbetegségekben, különböző gastrointestinalis tumorban, porphyria cutanea tardában, diabetesben szenvedtek, illetve máj- és vesetranszplantáción estek át. 100 egyén, laboratóriumi paraméterek szerint egészséges, korban illesztett férfi és nő alkotta a kontrollesoportot (Blázovics 1999, Lugasi 2001, Sárváry 2001, Szilvás 2001, Hagymási 2002, Kocsis 2004).

Eredmények

Az egészséges vér bővelkedik az antioxidánsok főbb típusaiban, de ezek eltérőek a plazmában és a vörösvértestekben. A vér plazmájának és vörösvértestjeinek antioxidáns paraméterei különbözőképpen változnak a betegségek alatt. A két biológiai anyag antioxidáns rendszerének teljes vizsgálata rutinszerűen nemcsak, hogy teljesen lehetetlen, hanem nagyon költséges, és valószínűsíthetően sok metodikai problémát jelent. Az irodalmi összefoglalásból kitűnik, hogy alkoholizmusban és gyulladásos bélbetegségekben, hasonlóan az epekőbetegséghez, vagy a rákos folyamatokhoz, más-más zavaró tényezőkkel kell számolni a kémiai meghatározások során.

Az alkohol, a bilirubin, antioxidáns gyógyszerek jelenléte, enzimaktivitások hiánya stb. miatt szükséges a különböző betegségekben az antioxidáns státuszt helyesen mérni és értelmezni. A vizsgálatok nagy része nem is végezhető el sok beteg esetében, pl. a vérzések miatt, vagy antioxidáns gyógyszerek szedése mellett.

Az általunk kifejlesztett módszer nem terheli a biológiai rendszert, mert testazonos hidrogén-peroxidot tartalmaz, a mikroperoxidáz gyakorlatilag a hempeptidhez hasonló vaskomplex, a luminol pedig az indikátor.

Ez a módszer alkalmas arra, hogy a különböző szövethomogenizátumok, sejtszuszpenziók, szövetnedvek szabad gyök - antioxidáns státuszát egyszerre vizsgáljuk. A vizsgált minta redoxiváltozásaira vonatkoztatva az azonosságokból és különbözőségekből a kezelések hatékonyságát meg lehet állapítani.

A módszer lényege:

Csekély mennyiségű humán plazmából (0,15 ml, ill. vörösvértestből 0,05 ml, ill. ekvivalens mennyiségű egyéb /lizált/ sejtből, vagy szövetből) történik a vizsgálat. A plazmát és vörösvértestet hagyományos módon szeparáljuk.

A kémiai reakció lényegében a $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}^-$ - mikroperoxidáz - luminol rendszer (pH 10,5) gátlása.

A $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}^-$ - mikroperoxidáz - luminol rendszer lúgos pH-n fényt bocsát ki, mert a vaskomplex hatására a H_2O_2 -ből $\text{OH}^\cdot$ gyök keletkezik a Fenton-reakcióban, és a gyök a luminolt gerjeszti. A luminol aminosztárolát stabil anionná alakul át és hv kvantum (420 nm) távozik. Ha a rendszerhez plazmát vagy vörösvértest-szuspenziót adunk, akkor ez a kémiai (kemilumineszcencia) reakció gátlódni fog. A gátlás mértéke és a betegség súlyossága között matematikai statisztikai módszerrel kapcsolat igazolható.

Az úgynevezett totál scavenger kapacitás érték (TSC) annál kisebb, minél súlyosabb a betegség.

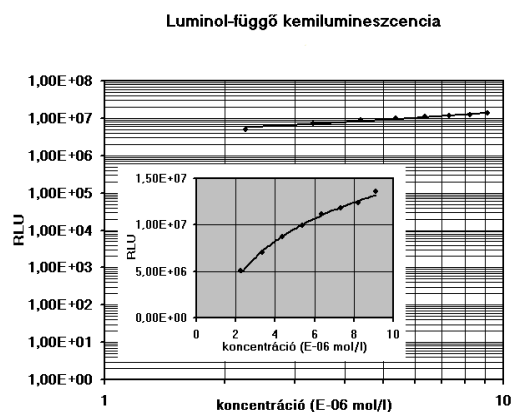
68. ábra

Ez a módszer - függetlenül az antioxidáns kezeléstől - jelzi a beteg homeosztázisát.

A méréshez Berthold Lumat 9501 készüléket használtunk.

A 68.-72. ábrák a módszer beállításához szükséges vizsgálatok eredményeit mutatják. A vizsgálatokat szobahőmérsékleten végeztük.

A matematikai analízis alapján (elvégezve a log-log transzformációt) az alábbi egyenletek adódtak a „stady state” állapot beállításához szükséges standard-görbék felvételekor:



69. ábra

Luminol koncentráció-függés:

$$y = 1E + 06x + 3E + 06; R^2 = 0,9737; p < 0,05$$

Hidrogén-peroxid koncentráció-függés:

$$y = -3E + 06x + 1E + 07; R^2 = 0,9831; p < 0,05$$

Mikroperoxidáz koncentráció-függés:

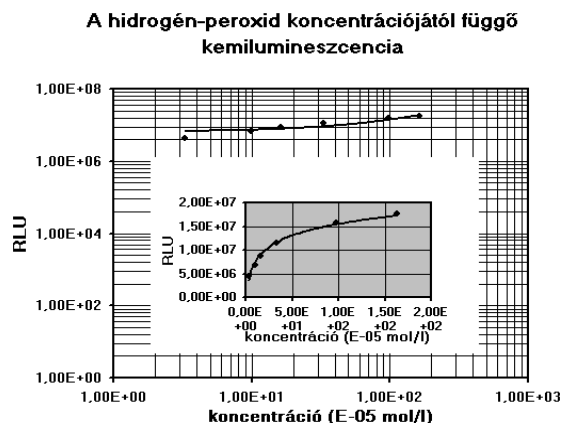
$$y = 75198x + 7E + 06; R^2 = 0,8661; p < 0,05$$

Időfüggés:

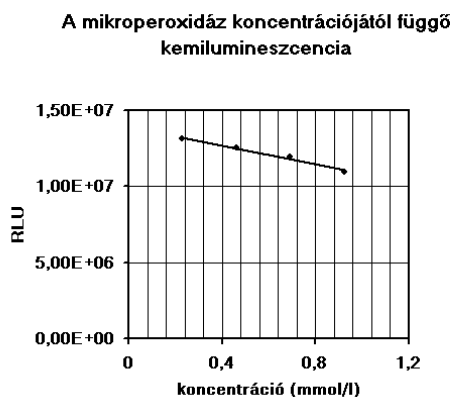
$$y = 161900x + 4E + 06; R^2 = 0,8135; p < 0,05$$

A regressziós analízis eredménye albumin-standard alkalmazásakor:

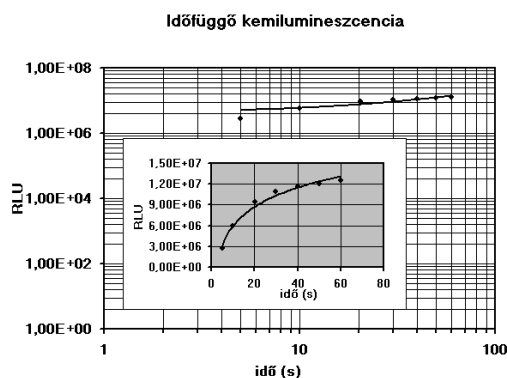
$$(y = 2E + 07e^{-0,4256x}; R^2 = 0,9238; p < 0,05)$$



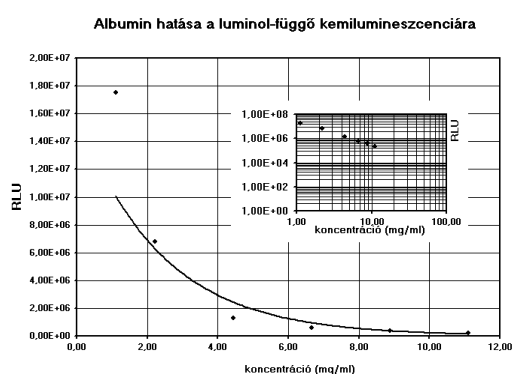
70. ábra



71. ábra



72. ábra



Következtetések

A Berthold típusú luminométer alkalmassá tehető szabadgyökös reakciók tanulmányozására is. Ezzel a metodikával lehetőség nyílik humán vizsgálatok rutinszerű elvégzésére. A módszerrel a szervezet szabad gyökökkel szembeni védekezésének általános állapotát mérhetjük fel. A további fejezetekben a módszer alkalmazhatóságát mutatom be

különböző betegségekben.

4.4.1. Vizsgálatok gyulladásos bélbetegségekben

Kísérleti körülmények

Betegek és kezelés: 26 önként jelentkező egyént választottunk be a kontrollcsoportba (10 férfi életkor: $26,6 \pm 11,3$ év és 16 nő életkor: $34,2 \pm 13,6$ év) (átlag $\pm$ szórás). Az IBD-ben szenvedőket CD-aktivitási index és CU-aktivitási index alapján inaktív, mérsékelt és súlyos állapotú csoportokba soroltuk. A 22 colitis ulcerosás beteg csoportosítása a következő volt: inaktív = 1 férfi, életkor: 19 év, és 3 nő, életkor: $48,0 \pm 23,0$ év; mérsékelt = 3 férfi, életkor: $36,3 \pm 16,5$ év, és 7 nő, életkor: $39,5 \pm 14,7$ év; súlyos = 4 férfi, életkor: $37,7 \pm 6,8$ év, és 2 nő, életkor: $30,0 \pm 5,6$ év; 2 férfibeteg extrém súlyos állapotban volt, életkor: $54,0 \pm 35,3$ év.

A 22 Crohn-beteg csoportosítása a következő volt: inaktív = 4 férfi, életkor: $33,5 \pm 13,0$ év, és 3 nő, életkor: $36,5 \pm 9,2$ év; mérsékelt = 7 férfi, életkor: $33,4 \pm 11,3$ év, és 3 nő, életkor: $50,3 \pm 6,8$ év; súlyos = 2 férfi, életkor: $38,0 \pm 12,7$ év, és 3 nő, életkor: $33,3 \pm 8,7$ év.

Az összes beteg (kaukázusi rasszhoz tartozó) a WHO ajánlása szerint megkapott minden szükséges gyógyszert. Az inaktív állapotú CU- és CD- betegek 5-ASA, ill. 5-ASA +

immunszuppresszor Imurant kaptak. A mérsékelten beteg CU és CD csoportok 5-ASA + lokálisan szteroid, vagy 5-ASA + Imuran + Klion-kezelést kaptak. A súlyos állapotú betegek CU-ban és CD-ben 5-ASA + lokális szteroid, vagy 5-ASA + szisztémás szteroid, és szteroid + Klion vagy Cyprobay antibiotikumot + elemi diétát kaptak.

Alkalmazott módszerek

A redukálóképességet Oyaizu (1986) szerint 700 nm-en határoztuk meg. A Fe^{3+} - Fe^{2+} átalakulást mértük és aszkorbinsav-ekvivalensben fejeztük ki az értéket. A H-donor-aktivitást Hatano (1988) módszerének kis módosítása (Lugasi és mtsai 1998) alapján 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil stabil gyök jelenlétében mértük 517 nm-en spektrofotometriásan. Az eredményt gátlás %-ban adtuk meg. A szabad SH-csoportot Ellmann szerint határoztuk meg és az eredmény dimenziója (mmol/l) volt (Sedlak 1986). A malondialdehid-tartalmat Pyles (1993) szerint detektáltuk spektrofotometriásan 532 nm-en. A szérumból A- és E-vitaminszinteket mértünk (Rudy 1989). A vörösvértestekből a kataláz (Beers 1952) és a GSHPx (Sedlak 1986) enzimek aktivitásának spektrofotometriás meghatározására került sor.

Célkitűzés

Ebben a kísérletben arra kerestük a választ, vajon tapasztalunk-e különbséget IBD-ben szenvedő betegek redox-homeosztázisában jól beállított terápia mellett, vagy sem, az általunk fejlesztett luminometrián alapuló módszer segítségével. A luminometriával kapott eredmények összhangban vannak-e más, a szervezet H-donor-aktivitását és redukálóképességét mérő módszerekkel kapott eredményekkel? Befolyásolják-e a kezelések a colitis ulcerosában és Crohn-betegségben szenvedő emberek vörösvértest össz-scavenger kapacitását, vagy sem? Hogyan változik a szervezet redox-homeosztázisa a betegségek különböző súlyosságú állapotában?

Eredmények

A betegek összes vizsgálata adekvát terápia mellett történt (Blázovics 1999a, 2000). Sem a vörösvértest-kataláz, sem a GSHPx-aktivitás nem különbözött szignifikánsan a kontrollcsoport értékeitől colitis ulcerosában és Crohn-betegségben (25. táblázat). Crohn-betegségben a szérum A-vitamin- és E-vitaminkoncentráció kisebb volt, mint colitis ulcerosában, de az adatok nem különböztek szignifikánsan a kontrollok értékeitől. A szérummaldialdehid koncentrációja több esetben nagyon magas volt Crohn-betegségben, ezért kaptunk nagy standard deviációt. A két vizsgált betegcsoport és a kontrollok között nem volt szignifikáns eltérés ennek a paraméternek a vizsgálata esetében sem (26. táblázat).

A vörösvértest enzimaktivitásai IBD-ben paraméterek		
minták (átlag ± szórás)	kataláz (BU/g prot.)	GSHPx (U/mg prot.)
kontroll (n=13)	6,44 ± 0,87	17,58 ± 1,64
colitis ulcerosa (n=22)	6,15 ± 1,25	17,00 ± 2,65
Crohn-betegség (n=22)	6,23 ± 0,88	17,45 ± 3,00
szignifikancia (p<0,05)	n.sz.	n.sz.

26. táblázat

Szérumparaméterek IBD-ben			
minták (átlag ± szórás)	MDA (nmol/l)	A-vitamin (μM/l)	E-vitamin (μM/l)
kontroll (n=13)	23,38 ± 10,34	1,86 ± 0,66	23,91 ± 10,45
colitis ulcerosa (n=22)	27,60 ± 17,10	1,96 ± 0,63	32,07 ± 7,36
Crohn-betegség (n=22)	42,72 ± 37,35	1,31 ± 0,37	27,75 ± 8,58
szignifikancia (p<0,05)	n.sz.	n.sz.	n.sz.

A plazma H-donor-aktivitása, redukálóképessége és szabad SH-csoport-koncentrációja csökkenő tendenciát mutatott súlyosabb stádiumú Crohn-betegségben a megfelelő kezelések alkalmazása mellett is (27. táblázat). Szignifikáns különbséget kaptunk a kontroll és a súlyos állapotban lévő betegek plazmájának H-donor-aktivitásában.

27. táblázat

A redox-homeosztázist tükröző plazmaparaméterek alakulása Crohn-betegekben			
minták (átlag ± szórás)	H-donor-aktivitás (%)	redukálóképesség (nmol AS)	szabad SH-csoport (mmol/l)
kontroll (n=26)	60,62 ± 1,98	174,54 ± 22,14	0,345 ± 0,031
Crohn-betegség inaktív (n=7)	58,67 ± 10,55	202,14 ± 25,40	0,400 ± 0,230
mérsékelt (n=10)	47,34 ± 10,26	203,50 ± 24,20	0,386 ± 0,034
súlyos (n=5)	42,86 ± 4,52	168,20 ± 16,36	0,386 ± 0,033
szignifikancia (p<0,05)	kontroll vs. súlyos	n.sz.	n.sz.

A redukálóképesség és a szabad SH-csoport-koncentrációk nem mutattak szignifikáns különbségeket a különböző állapotok között colitis ulcerosában (28. táblázat), ami szintén összefügghet az antioxidáns tulajdonságú 5-ASA kezeléssel.

Szignifikáns különbség volt a plazma H-donor-aktivításban a kontroll, az inaktív és a súlyos állapotú colitises betegek között.

A vörösvértestek vizsgálata azonban jelezte, hogy a Crohn-betegség mindhárom súlyossági fokában és súlyos colitis ulcerosában az 5-ASA adekvát kezelés mellett is csökkent az úgynevezett össz-scavenger kapacitás, amely a különböző oxidációs folyamatok és az antioxidáns védekezés eredője (29. és 30. táblázat). Úgy tűnt, hogy az alkalmazott kezelések csak a colitis ulcerosában szenvedő betegeknél javítják a vörösvértest össz-scavenger kapacitását.

A háttérfény intenzitását 100 %-nak véve, az adatokat RLU %-ban adtam meg, azaz, a megmaradt fényintenzitást tüntettem fel, így a magasabb értékek rosszabb össz-scavenger kapacitást jelentenek.

28. táblázat

A redox-homeosztázist tükröző plazmaparaméterek alakulása colitis ulcerosában			
minták (átlag $\pm$ szórás)	H-donor-aktivitás (%)	redukálóképesség (nmol AS)	szabad SH-csoport (mmol/l)
kontroll (n=22)	60,62 $\pm$ 1,98	174,54 $\pm$ 22,14	0,345 $\pm$ 0,031
colitis ulcerosa inaktív (n=4)	45,88 $\pm$ 3,04	200,25 $\pm$ 8,77	0,407 $\pm$ 0,070
mérsékelt (n=10)	52,01 $\pm$ 11,73	183,00 $\pm$ 37,07	0,400 $\pm$ 0,030
súlyos (n=8)	45,44 $\pm$ 3,00	193,33 $\pm$ 18,33	0,396 $\pm$ 0,051
szignifikancia (p<0,05)	kontroll vs. inaktív vs. súlyos	n.sz.	n.sz.

Hasonló kemilumineszcenciás jelenséget tapasztaltunk a plazma össz-scavenger kapacitásának vizsgálatakor is mindkét betegségben (72., 73. ábrák).

Az y axison a RLU % értékek látszanak. Azt találtuk, hogy colitis ulcerosában és Crohn-betegségben a betegség legsúlyosabb állapotában volt a legkisebb az antioxidáns kapacitás. Két colitises beteg esetében kiugróan magas értéket (RLU %~70) mértünk az alkalmazott (H₂O₂/OH - luminol - mikroperoxidáz) rendszerben. Ez a két beteg a mérést megelőző néhány napban kapott csak megfelelő kezelést a betegség fellángolása miatt.

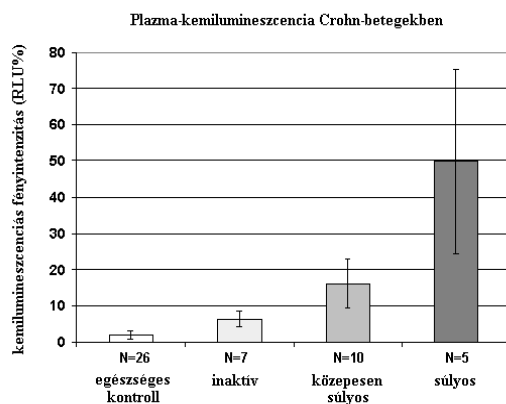
29. táblázat

A vörösvértest kemilumineszcenciás intenzitása hidrogén-peroxid/hidroxil - luminol – mikroperoxidáz rendszerében			
kontroll (n=26)	Crohn-betegség (átlag ± szórás)		
	inaktív (n=7)	mérsékelt (n=10)	súlyos (n=5)
31,19 ± 6,08	107,73 ± 14,01	95,22 ± 7,47	110,95 ± 20,43
szignifikancia (p<0,05)	kontroll vs. inaktív	vs. mérsékelt	vs. súlyos

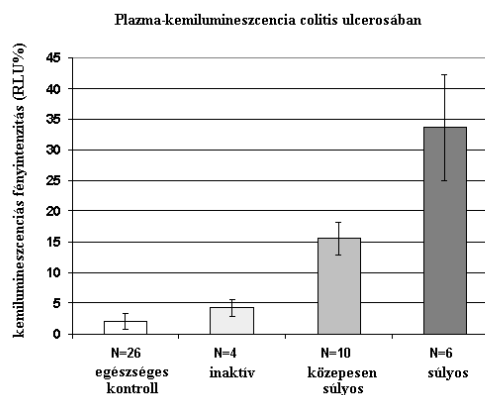
30. táblázat

A vörösvértest kemilumineszcenciás intenzitása hidrogén-peroxid/hidroxil - luminol – mikroperoxidáz rendszerében			
kontroll (n=26)	colitis ulcerosa (átlag ± szórás)		
	inaktív (n=4)	mérsékelt (n=10)	súlyos (n=18)
31,19 ± 6,08	40,49 ± 6,25	61,33 ± 6,62	110,68 ± 25,62
szignifikancia (p<0,05)	kontroll	vs. mérsékelt	vs. súlyos

72. ábra



73. ábra



Következtetések

Az irodalmi áttekintésben bemutattam, és saját kutatásainkban is azt találtam, hogy az antioxidáns enzimek aktivitásának, a vitaminok és funkciós csoportok koncentrációinak külön-külön történő meghatározása sok esetben nem reprezentálja a betegek redox-homeosztázisát. Tehát olyan módszereket adaptáltunk, illetve fejlesztettünk ki, amelyek a szervezet redukálóképességét, a szabad gyökökkel szembeni védekező tulajdonságát, állapotát képes meghatározni. Ilyen módszer az általunk módosított H-donor-aktivitás és redukálóképesség meghatározás, illetve a saját fejlesztésű luminometriás meghatározások.

Megállapítottuk, hogy a plazmában mért össz-scavenger kapacitás érték azt az állapotot mutatja, amely a mérési időben jelzi a beteg redox-homeosztázisát, míg a vörösvértestben mért érték egy hosszabb időintervallum állapotát tükrözi.

4.4.2. Raphacol-kezelés hatása gyulladásos bélbetegségekben

Kutatócsoportunkban az elmúlt évek során számos in vitro és in vivo vizsgálatot végeztünk a feketeteretek-présle és a présleből készült Raphacol epegranulátum élettani hatásának megismerésére.

A feketeteretek (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) a keresztesvirágúak (*Brassicaceae*, *Cruciferae*) családjába tartozó kultúrnövény. A népi gyógyászatban évszázadok óta ismert emésztésjavító, epehajtó, epekőképződést megakadályozó, fűreghajtó, de leírták vesekőoldó és légzéskönnyítő hatását is (Böhm 1959, Jakobey 1988, Pahlov 1989, Varró 1991, Liu 1995, Vargas 1999).

Gyógyhatású komponensei a glükozinolátok, illóolajok, enzimek, enzim-inhibitorok, mikroelemek, B- és C-vitaminok, flavonoidok és polifenolos vegyületek (Petri 1999, Lugasi 2001). Rafanintartalma miatt baktérium- és gombaölő hatású. Leírták a feketeteretek belek falát tonizáló és perisztaltikát fokozó hatását is (Weiss 1985).

A feketeteretek glükozinolátjai mirozináz enzim aktivitására izotiocianátokká (aglukonok) alakulnak (Fenwick 1983, Rosa 1996). A glükozinolátok családjában 100-nál több vegyületet azonosítottak (Kühnau 1976). A feketeteretek glükozinolátjai 97%-ban 4-metiltiobutenil szerkezetű vegyületek (Ciska 1994). E vegyületeket tartalmazó növényi élelmiszerek jelentős mennyiségű fogyasztása kedvezőtlenül befolyásolja a pajzsmirigy működését elégtelen jódbevitel esetén. A feketeteretek glükozinolátjai a feldolgozás alatt mirozináz enzim hatására izotiocianátokká alakulnak (Tookey 1980). Az intakt növény alifás glükozinolátjai: (mg/g nedves tömeg) progoitrin (1,1), glükorafenin (0,2), glükorafenin (12,6), napoleiferin (2,4), glükooallizin (0,8), glükoeerucin (7,5), 4-metiltio-butenil glükozinolát (997,8). Arkaril-glükozinolátok csak nyomokban fordulnak elő. Indol-glükozinolátok: 4-OH-glükobrasszicin (5,3), glükobrasszicin (8,7), 4-metoxi-brasszicin (5,8), neoglükobrasszicin (6,3) (Lugasi 2001).

A feketeteretek 10 mg/kg mennyiségben tartalmaz kempferolt, főleg glikozidjaiban, továbbá a fenolsavak közül a p-kumarinsavat és ferulasavat (Eloesser 1975, Stohr 1975). Más vizsgálatokkal 1 mg/kg kvercetin és 6,2 mg/kg kempferolt (Hertog 1992), illetve különböző Magyarországon honos fajtákban 5,7- 21,1 mg/kg kempferolt igazoltak (Lugasi 2001).

A készítmény alapanyaga, a feketeteretek-présle, a részleges fitokémiai elemzés alapján azonban glükozinolátokat nem tartalmazott (Lugasi 1998). A fő bioaktív komponensek a következők: (mg/100ml) aszkorbinsav (5,0), karotin (0,02), tokoferolok (0,31), polifenolok (25,5), kvercetin

(0,066), kempferol (0,495). A fémionanalízis szerint toxikus ionok nem fordultak elő a préselésben. A K/Na arány 10,5:1 és a Ca/Mg arány 2,1:1 volt. (Lugasi 2001).

A 31. táblázat a feketeteretek-présle szárazanyagára számított elemösszetételt tartalmazza (Kovács 2001).

31. táblázat

A feketeteretek -présle elemösszetétele (átlag ± szórás) (µg /g)			
Al	4,33 ± 0,18	K	2100 ± 25,46
B	0,896 ± 0,211	Mg	78,64 ± 6,24
Ba	0,095 ± 0,006	Mn	0,375 ± 0,001
Ca	170,8 ± 4,3	Na	164,5 ± 13,4
Cr	0,023 ± 0,003	P	241,1 ± 0,6
Cu	0,068 ± 0,010	S	419,7 ± 5,3
Fe	0,37 ± 0,073	Zn	0,769 ± 0,02

A présle antioxidáns tulajdonságát a H-donor-aktivitás, a redukálóképesség, a komplexképzés, a TAS, az össz-scavenger kapacitás, a szuperoxidanion gyökfogó-képesség, és a lipidperoxidációt gátló hatás alapján igazoltuk (Lugasi 1998, 2000, 2002, Kocsis 2002).

Állatkísérletekben a feketeteretek-présle kísérletes hyperlipidaemiában lipidszintcsökkentő hatásának bizonyult. Ebben a hatásban feltételezhető a présle (általunk nem meghatározott) fitoszterin tartalma is.

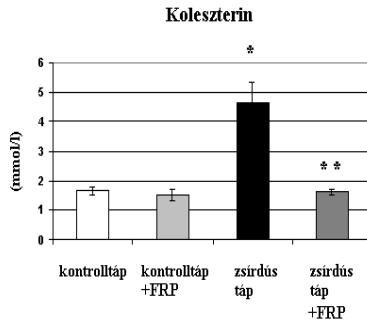
Irodalmi adatok szerint az összes fitoszterin koncentráció 9 mg/kg, amelyből 4,4 mg a β -szitoszterol (Normen 1999). Egyes flavonoidok gátolják a HMG-CoA reduktáz és az ACAT enzimek aktivitását, ami koleszterinszint-csökkentő hatásban nyilvánul meg (Lugasi 2001, Lebovics 1996). Présle-kezelésre kísérletes hyperlipidaemiában javultak a szérum májenzim értékek. A feketeteretek antioxidáns tulajdonsága in vivo is kimutatható volt.

Az alábbi ábrákon (75.-80.) a feketeteretek-présle hatását mutatom be kísérletes zsírmájban. A patkányokat 9 napig ad libitum 150 ml/ttkg préselével itattuk, szükség esetén a folyadékpótlást csapvízzel egészítettük ki (Lugasi 2001, 2004, Kocsis 2004).

A kezelés hatására a hyperlipidaemiás patkányokban szignifikánsan csökkentek a szérumkoleszterin, triglicerid és LDL-koleszterin értékek, mérséklődött a koleszterin és a zsírsavak oxidációja. A máj diénkonjugátum- és malondialdehid-szintje a kezelésre szintén csökkent. A kontrolltápon tartott és préselével is kezelt állatok vizsgált értékeiben a kontrollokéhoz képest nem volt szignifikáns változás. (Az eltérő számú csillagok a szignifikáns különbséget jelölik a kontrollcsoporthoz (*), illetve a zsírdús diétán (***) tartott állatcsoporthoz képest (75.-80.ábrák)

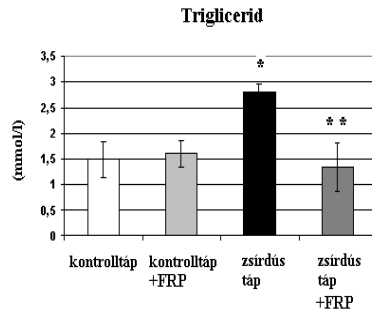
75. ábra

A feketeetek hatása a patkányszérum lipidparamétereire



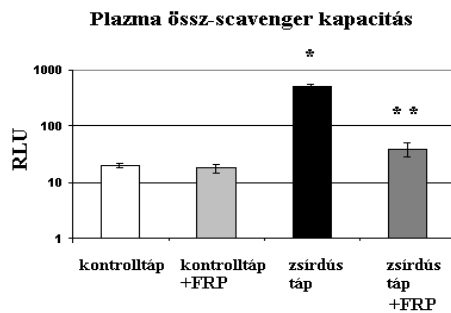
77. ábra

A feketeetek hatása a patkányszérum lipidparamétereire



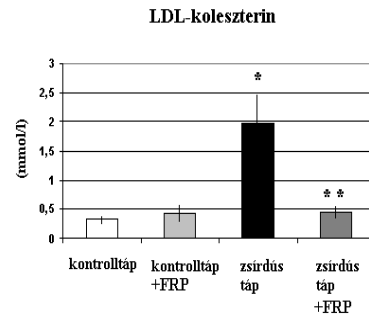
79. ábra

A feketeetek hatása a redox-homeosztázisra



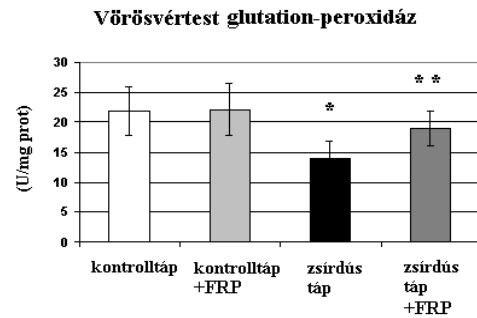
76. ábra

A feketeetek hatása a patkányszérum lipidparamétereire



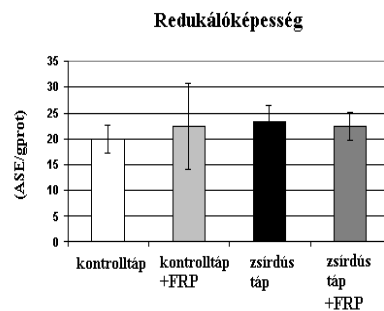
78. ábra

A feketeetek hatása a redox-homeosztázisra



80. ábra

A feketeetek hatása a patkánymáj redox-homeosztázisára



Raphacol-kezelésre mind a májban, mind a plazmában nőtt a szöveti antioxidáns kapacitás. A szérumban emelkedett az A- és E-vitamin koncentrációja. A vörösvértestekben nőtt a SOD és a glutation-peroxidáz aktivitása. A préselé a hyperlipidaemiás patkányok MFO-rendszerének enzimaktivitásait az egészséges állatok értékeihez közelítette (Lugasi 2001, 2002, 2004, Kocsis 2002, Blázovics 2002).

Epekővesség megelőzése és a lipidanyagcsere normalizálása céljából tanulmányoztuk a feketeteretek-présle alapú Raphacol epegranulátum hatását az I. és II. típusú diabeteses betegek redox-homeosztázisára. Szignifikáns lipidszintcsökkentő hatást, és HDL-koleszterinszint növekedést, valamint hemoglobin-A1c- és glikohemoglobin-koncentráció csökkenést tapasztaltunk a kezelés 6. hónapjának végére. A legtöbb szérumparaméter koncentrációja azonban nem változott. A betegek szubjektív panaszai javultak a kúra alatt (Lugasi 2001a,b).

Célkitűzés

Mivel Crohn-betegségben és ileum resectiot követő állapotokban is gyakori az epekővesség, az epekőképződés megelőzésében hasznos lehet a cholereticus, cholekineticus hatású Raphacol epegranulátum. A feketeteretek-présle felhasználásával készült epegranulátum gyulladáscsökkentő, lipidperoxidációt gátló és gyökfogó tulajdonsága kedvező lehet a gyulladásos bélbetegségekben szenvedő betegek diszkonfort érzésének mérséklésére. Feltételeztük, hogy a készítmény polifenol-, flavonoid-, valamint vitamintartalma jelentősen befolyásolja a bélhámsejtek redoxi-állapotát. A készítmény enyhe baktericid, fungicid hatása védelmet biztosíthat a bél normális bélflórájának. E megfontolások alapján prevenciós céllal adtuk a Raphacolt IBD-seknek. Arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen időintervallum alatt jelentkezik kedvező hatás, és a több hónapos kezelés alatt jelentkezik-e egyáltalán nem kívánt mellékhatás.

A készítmény ismertetése

A Raphacol epegranulátum a Parma product Kft. terméke, (OGYI-090/1988, megújítva 1998, forgalmazási engedély száma: 3386/68/89 98.07.11) melyet a gyártó kutatási támogatásként biztosított a betegek számára. A készítmény 60 g feketeteretkből nyert friss préslet és 0,25 g édesköményolajat (*Aetheroleum foeniculi*) tartalmaz 100 g inaktív hordozó granulátumra porlasztott formában. Javasolt kúraszerű dózisa: naponta minimum 0,2 g.

Kísérleti körülmények

Mind az IBD-ben szenvedő csoportba, mind a Raphacol-kezelt IBD-csoportba közepesen súlyos stádiumú betegeket választottunk be. Az adatok kiértékelésénél nem tettünk különbséget a nemek között, mivel korábbi vizsgálatainkban a férfiak és nők esetében a redox-homeosztázisban nem kaptunk szignifikáns különbséget. A betegségre jellemző, hogy a tünetmentes és aktív állapotok időtartama, és gyakorisága változó, illetve a gyulladás különböző súlyossági állapotaiban szignifikáns eltérések tapasztalhatók a vér redoxi-paramétereiben még megfelelő antioxidáns terápia mellett is (Blázovics 1999a, 2000).

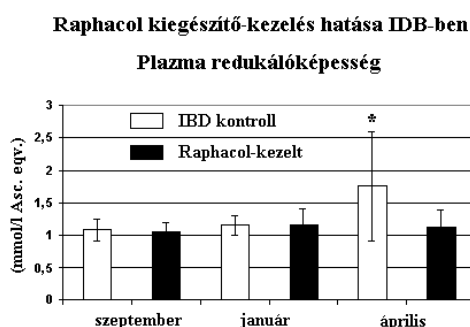
A vizsgálatokba önként jelentkező 25 IBD-ben szenvedő 10 férfit és 15 nőt vontunk be. Mindhárom mérési időpontban az értékelhető adatok 6 férfitől és 10 nőtől származtak. (átlagéletkor: $42,5 \pm 12,7$) A kezelést különböző okok miatt kellett megszüntetni. Két férfi esetében műtétre került sor, egy férfi émelygett a Raphacol szagától, egy nőbeteg a megengedett

dózis többszörösét vette be, mert így több zsíros ételt fogyaszthatott saját bevallása szerint. Egy nő és egy férfi nem szedte rendszeresen a készítményt, 3 nő remisszióba került. A random kiválasztott IBD-s kontrollcsoport (10 férfi és 15 nő) nem kapott Raphacol kiegészítő-kezelést. (átlagéletkor: $47,5 \pm 15,7$) A kísérlet során csak azt tartottuk szem előtt, hogy a betegek állapota közepesen súlyos stádiumú legyen az ellenőrző mérések időpontjában, ezért a vizsgálati időpontokban a betegek száma és neme változott. Összesen 7 férfi és 9 nő adatait dolgoztuk fel. A betegek orvosi ellátása, felügyelete és ellenőrzése biztosított volt. A kezelés félévig tartott. A laboratóriumi vizsgálatokat a kezelést megelőzően, majd 3 és 6 hónap elteltével végeztük. A betegek hasi UH-vizsgálata alapján kizártuk az epeköbetegséget. Kizáró ok volt a tumor, diabetes mellitus és a májbetegségek. A betegek a kúra alatt minden szükséges gyógyszert szedtek. A Raphacol-kezeltek féléven át $0,2\text{ g}$ Raphacol epegranulátumot kaptak főétkezésükhöz. A készítmény hatását a redox-homeosztázisra a szokásos ellenőrző vizsgálatokkal egy időben végeztük, így az külön nem terhelte a betegeket. A vizsgálatok megegyeztek az előző, 4.4.1. fejezetben leírtakkal.

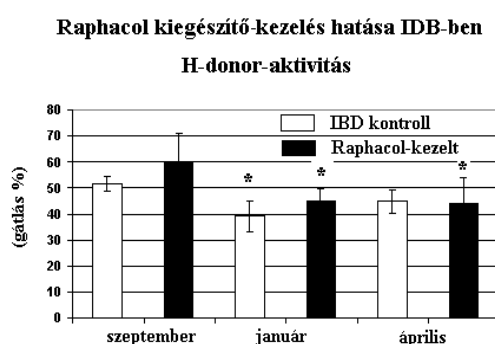
Eredmények

A Raphacol az adott dózisban nem befolyásolta sem a betegség remisszióját, sem pedig progresszióját, így a kezelés alatt a betegek CD- és CU-aktivitás mutatói változtak. A Raphacollal nem kezelt IBD-seknél is mindhárom mérési időpontban csak a közepesen aktív betegek adatait dolgoztuk fel. A következő ábrákon (81.-89.) a Raphacol-kezelés hatását kívánom bemutatni a redoxi-paraméterek változására. (Szignifikancia: $p < 0,05$ * vs megfelelő kiindulási érték.)

81. ábra



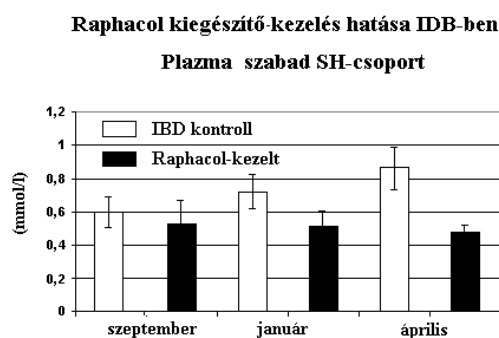
82. ábra



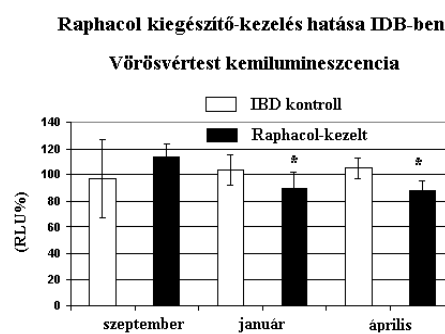
A Raphacollal nem kezelt IBD-s betegek plazmájának redukálóképessége január hónapban $1,18 \pm 0,18\text{ mmol/leqAS}$ volt, és áprilisra ez az érték $1,75 \pm 0,85\text{ mmol/leqAS}$ -ra nőtt. A Raphacol-kezelteké pedig nem változott. A plazma H-donor-aktivitása a kísérleti IBD-kontrollcsoportban januárban $39,16 \pm 6,11\text{ gátlás \%}$, míg a Raphacolos csoportban $45,35 \pm 4,11\text{ gátlás \%}$ -nak adódott. Ez a paraméter áprilisra $44,67 \pm 4,45\text{ gátlás \%}$ -ra nőtt a Raphacolt nem szedők esetében,

és a Raphacolos csoportban viszont enyhén csökkent, de a szeptemberi értékhez viszonyítva szignifikáns csökkenést tapasztaltunk. A szabad SH-csoport koncentrációja a plazmában szintén ellentétesen változott a két betegcsoport között. A Raphacolos csoportban csökkent, a kontrollokban pedig nőtt a kiindulási értékhez viszonyítva (83., 84. ábrák).

83. ábra

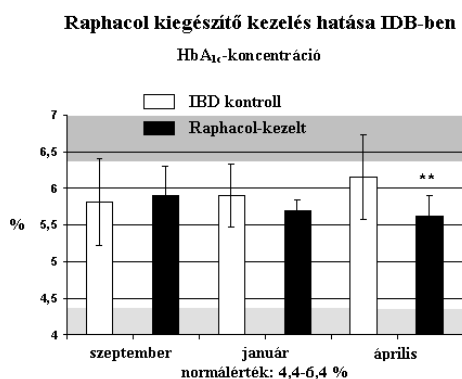


84. ábra



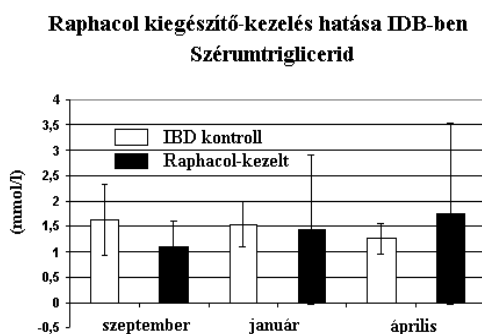
A vörösvértest-kemilumineszcencia a Raphacol-kezelteknél szignifikánsan csökkent a hat hónap alatt ($113,36 \pm 9,85 \rightarrow 87,73 \pm 7,65$ (RLU%)), míg a nem kezelt kontrollcsoportban nem tapasztaltuk ezt a kedvező változást (84. ábra). A HbA_{1c} koncentrációk nem szignifikáns mértékben szintén csökkentek (85. ábra). A HbA_{1c}-koncentráció az IBD – kontrolloknál januárban $5,90 \pm 0,43$ %, a Raphacol-csoportban $5,70 \pm 0,14$ % volt. Ez az érték áprilisra az IBD-kontrolloknál, $6,15 \pm 0,58$ míg a Raphacolos csoportban $5,62 \pm 0,28$ % -ra csökkent. A csoportok között áprilisban szignifikáns (**) volt a különbség. A koleszterin koncentrációja fokozatosan csökkent, viszont a triglicerid-koncentráció inkább nőtt a Raphacolos csoportban. A triglicerid szérumszintjének növekedése feltehetően táplálkozási fegyelmezetlenség következménye (86., 87. ábrák).

85. ábra

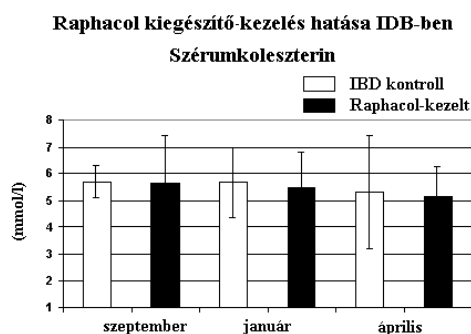


növekedése feltehetően táplálkozási fegyelmezetlenség következménye (86., 87. ábrák).

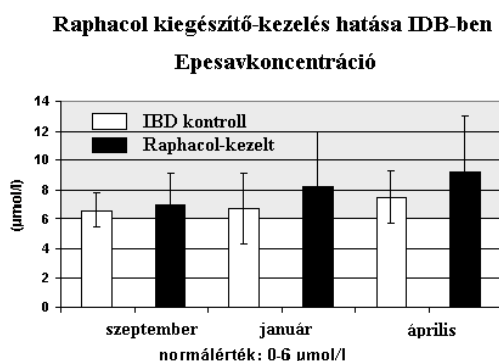
86. ábra



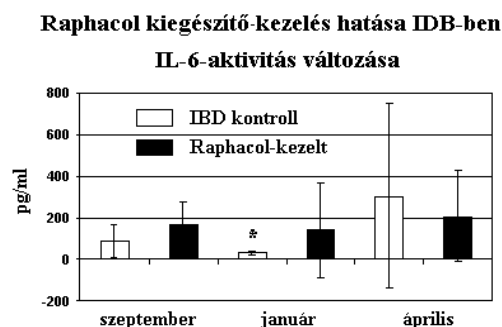
87. ábra



88. ábra



89. ábra



Az epesavkoncentráció a Raphacol-kezelés alatt a nagy szórást figyelembe véve mérsékelten nőtt, míg az IBD-s kontrollokban kisebb mértékben változott (88.ábra).

A bevizsgálás alkalmával megvizsgált 90 betegnél a citokinek közül csak az IL-6-koncentráció meghatározása volt informatív. Az IL-1 β és a TNF- α szérumszintek nagyon alacsonyak voltak. Az IL-1 β -aktivitás 90 Crohn-beteg vizsgálatakor összesen négy esetben, míg a TNF- α -aktivitás csupán egy Crohn-betegnél volt detektálható az általunk használt kitekkel. (Lásd a 3.8.6.1., 3.8.6.2., 3.8.6.3. alpontokat és a 2.1.2. fejezetet!) Mivel ezek a betegek nem kerültek be egyik vizsgálati csoportba sem, így e két citokinnel nem foglalkoztunk a továbbiakban.

Az IL-6-koncentráció áprilisban a Raphacollal nem kezelt IBD-s betegekben $305,0 \pm 444,4$ pg/ml, míg a Raphacol-kezelésben részesülteknél az IL-6 szintje $207,6 \pm 217,3$ pg/ml volt. A 89. ábra mutatja az IL-6-koncentráció változását a kezelési periódus alatt.

Következtetések

A Raphacol epegranulátummal történő fél éves kiegészítő-terápia IBD-s betegekben nem volt befolyással a betegség fellángolására és remissziójára. IBD-ben a kedvező szubjektív megítélés mellett, a periódus végére kismértékben megemelkedett a szérumepesav-koncentráció, mely nem kívánatos. Romlottak a plazmában a redoxi-paraméterek értékei (redukálóképesség, H-donor-aktivitás, szabad SH-csoport). Lényeges eltérést nem tapasztaltunk a szérumparaméterekben a kiegészítő-kezelés alatt. A Raphacol epegranulátum szignifikánsan csökkentette a vörösvértest-kemilumineszcenciát és mérsékelten csökkentette a vörösvértestek HbA1c koncentrációját, ami kedvező. A kapott adatokból arra lehet következtetni, hogy a készítmény már ilyen kis koncentrációban (0,2 g/nap) is hosszú távon képes befolyást gyakorolni a redox-homeosztázisra. A készítmény, összetétele miatt valószínűleg több szinten és több ponton is módosítja a redoxi-reakciókat. A betegek szubjektív panaszai enyhültek az epehajtó, és emésztést javító feketeteretek alapú Raphacol granulátum hatására, ezért előfordult, hogy fegyelmezetlenebbé váltak az étkezésben, és több zsírféleséget fogyasztottak, mint általában (Blázovics 2004f).

4.4.3. Vizsgálatok tumoros betegekben

Az elmúlt két évtizedben bizonyítottá vált a szabad gyökök kóroki szerepe a carcinogenesisben is. Korábbi vizsgálatainkban magunk is azt találtuk, hogy a rectum- és colonlokalizációjú tumorok esetében a lumineszcenciás vizsgáló módszerrel a szérum és plazma antioxidás kapacitásértékek szignifikánsan rosszabbak voltak, mint az egészséges egyéneké (Szilvás 1999, 2001). Azt is megfigyeltük, hogy az inoperábilis állapotokban volt a legnagyobb különbség a kontrollokhoz viszonyítva. Az inoperábilis betegeknél a szérum és a plazma szabad SH-csoport-koncentrációkban is csökkent értéket találtunk (Szilvás 2001a).

Az utóbbi évek kutatásai igazolták, hogy a colontumoros betegek vörösvértest TBARS-inak koncentrációja szignifikánsan nagyobb ($45,08 \pm 21,37$ nmol/gHb) az egészségesekhez viszonyítva ($33,18 \pm 4,38$ nmol/gHb), és a kataláz-aktivitás (tumoros beteg: $109,59 \pm 30,80$ U/mgHb vs kontroll: $193,40 \pm 19,25$ U/mgHb), valamint a GSHPx-aktivitás (tumoros beteg: $8,84$ U/mgHb vs. kontroll: $12,35 \pm 2,08$ U/mgHb) szignifikánsan kisebb, míg a SOD-aktivitás nem különbözik a kontrollokétól. Tumorban megváltozik a vörösvértestek fémionösszetétele is (Djujić 2003). Ezeknek az adatoknak az alapján a szuperoxidion $\rightarrow$ hidrogén-peroxid átalakulás, és a hidrogén-peroxid $\rightarrow$ víz átalakulás elégtelen volta és a jelenlévő fémionok Fenton-típusú reakciók révén járulnak hozzá a szabad gyökök túltermeléséhez, és a lipidperoxidáció felerősödéséhez a vörösvértestekben.

Kísérleti körülmények

Ebben a kísérletsorozatban 113 IBD (34 colitis ulcerosa, 79 Crohn-beteg) és 45 colontumoros beteget vizsgáltunk meg. Az életkor 25 és 60 év között volt. Nem volt szignifikáns különbség az életkorban a különböző csoportok között. A random kiválasztott betegek közül 19 CD és 2 CU férfibeteg, 9 CD és 6 CU nőbeteg, 7 IBD férfi- és 3 IBD nőbeteg esetében a kemilumineszcenciás vizsgálatok mellett meghatároztuk a plazmában a TAS-t, redukálóképességet, H-donor-aktivitást, a vörösvértest-GSHPx- és vörösvértest-SOD-értékeket is. A redoxiparaméterek meghatározásakor nem terveztünk egyéb csoportbeosztást, és nem vizsgáltuk a kezelések közötti különbségeket sem. (Ha a diagnózis nem volt egyértelmű, a betegeket „IBD” csoportba soroltuk.)

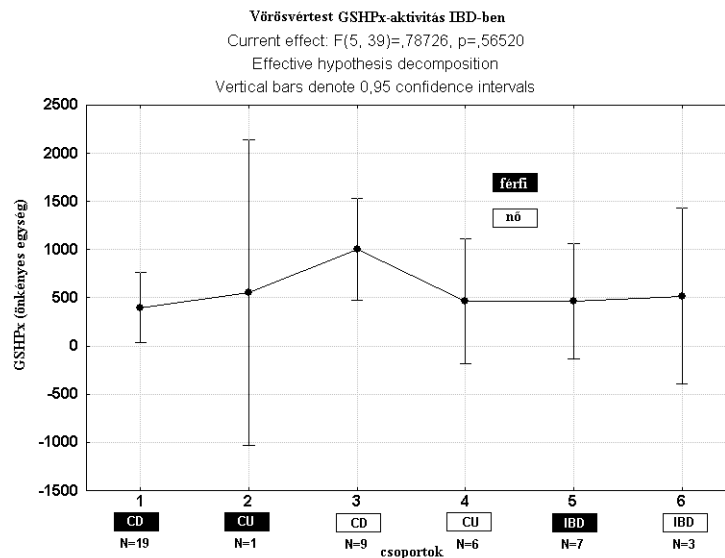
Célkitűzés

Eddigi tanulmányaink sokoldalú kiértékelése alapján feltételeztük, hogy a rutinvizsgálatokra kifejlesztett, nem invazív luminometriás módszerünk alkalmas lesz tumoros betegek vörösvértestjeinek vizsgálatára is. Arra voltunk kíváncsiak, vajon módszerünkkel lehetséges-e a vastagbél-daganatok és a gyulladásos bélbetegségek megkülönböztetése. Amennyiben szignifikáns eltérést kapunk más betegségekkel is összehasonlítva, akkor a vizsgálati eredmények prediktív faktornak tekinthetők.

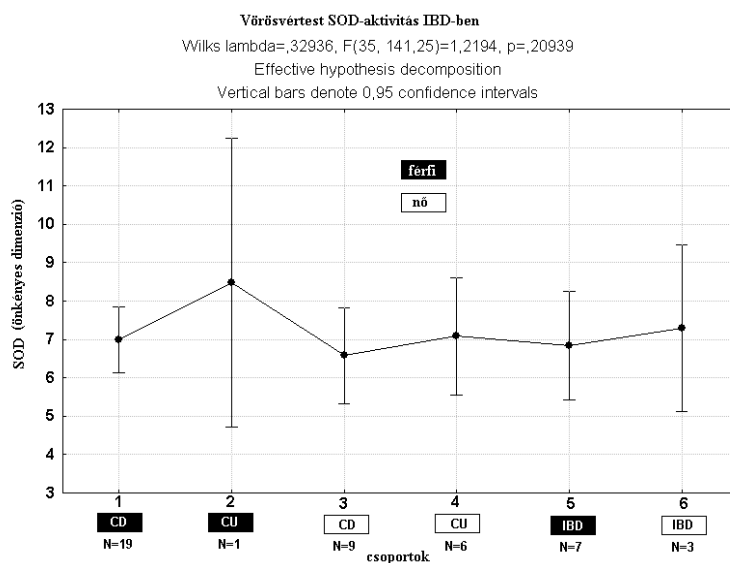
Eredmények

Az alábbi statisztikai kiértékelések azt mutatták (90.-95. ábrák), hogy az IBD egyes típusai között ebben a tanulmányban nem volt szignifikáns különbség az egyes férfi- és nőbetegcsoportok között a különböző plazma- és vörösvértest-paraméterekben, kivéve a 96. ábrán jelölt plazma-redukálóképességet. Ebben kedvező változás volt a férfi IBD betegekben, a nő CD és CU betegekhez viszonyítva. A betegek minden csoportban súlyos, vagy mérsékelten súlyos állapotban voltak a vizsgálatok során. Megfigyeltük, hogy a nyári hónapokban a plazma- TSC jobb értékeket mutatott, mint a téli hónapokban. (Lásd az előző 4.4.1. fejezetet!)

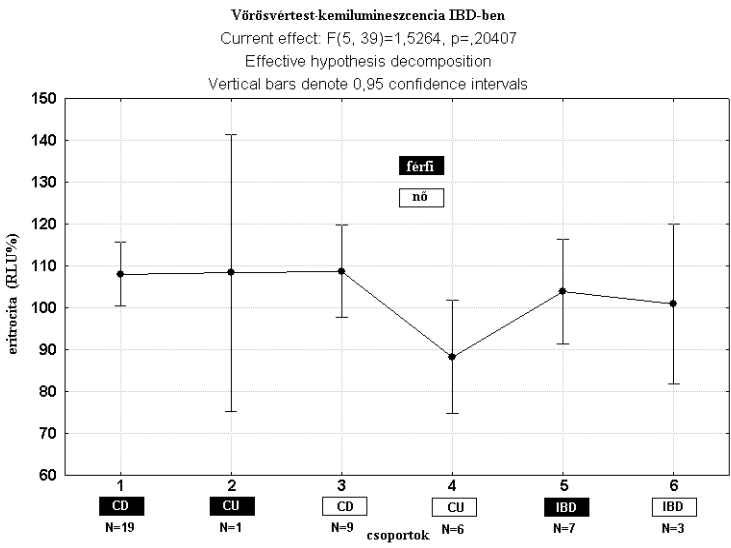
90. ábra



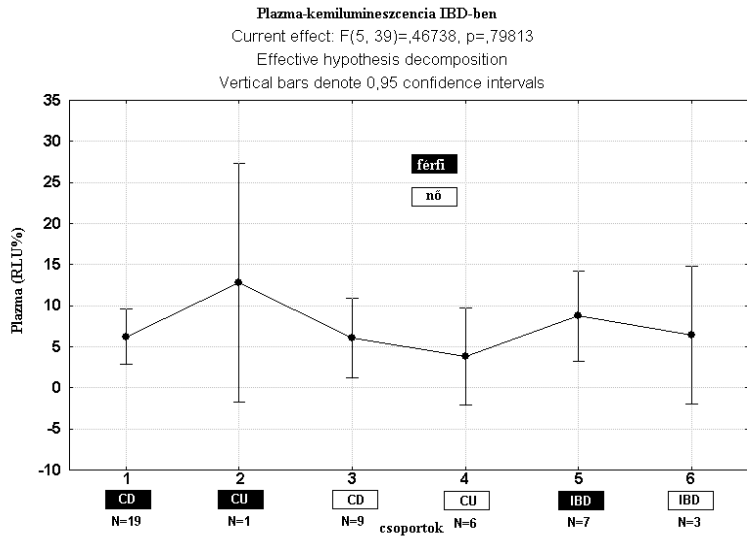
91. ábra



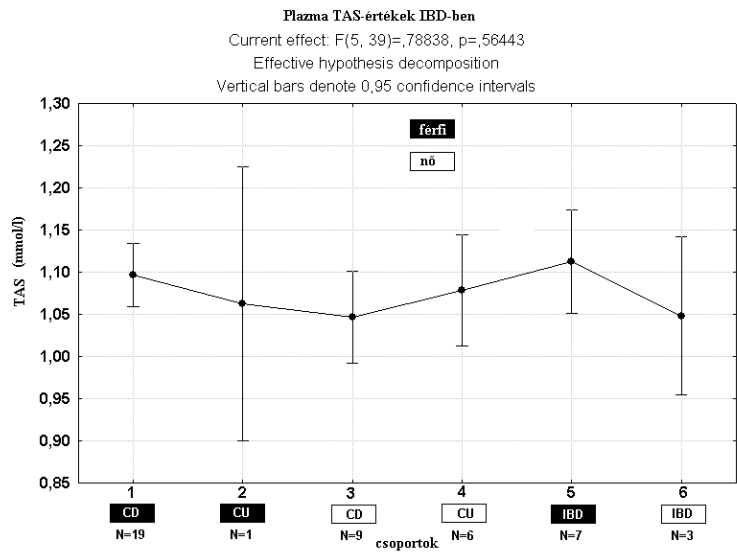
92. ábra



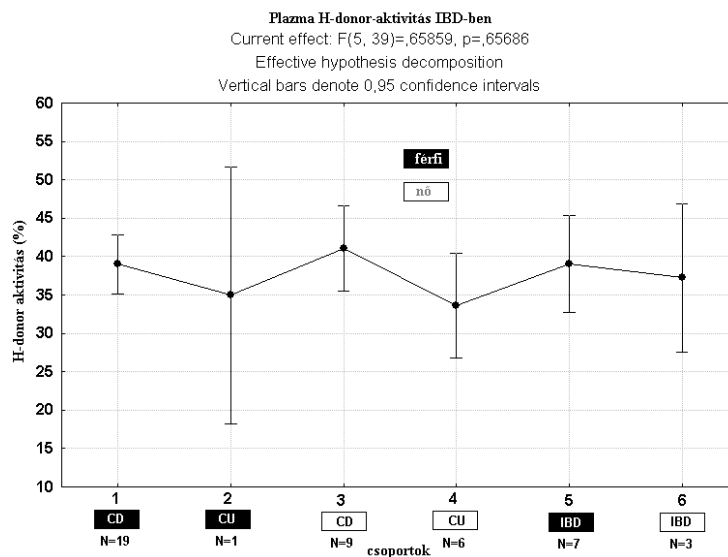
93. ábra



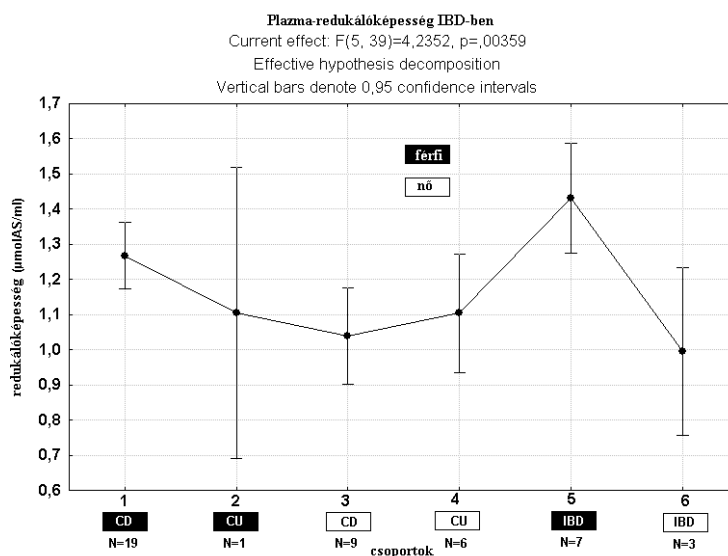
94. ábra



95. ábra

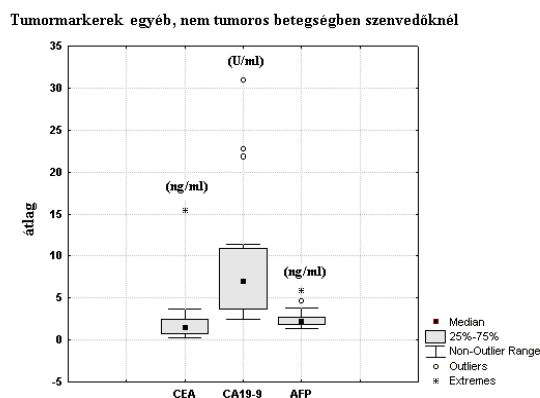


96. ábra

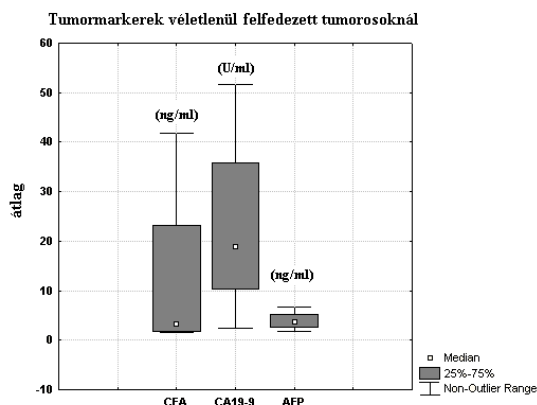


A 92. ábra statisztikai elemzéséből kiderül, hogy a vörösvértest-kemilumineszcencia egyetlen esetben sem érte el IBD betegek egyik csoportjában sem a 150 RLU %-os értéket. A vörösvértestek össz-scavenger kapacitása, ami a rendszerben mérhető kemilumineszcenciás fényintenzitás reciproká, jó mutatója a rákos folyamat különböző stádiumainak. Vizsgálatainkat AFP, CEA és CA 19-9 tumormarker meghatározásokkal hasonlítottuk össze. (A betegek háromdimenziós ultrahangvizsgálata minden esetben megtörtént.) Az alábbi ábrákon (97.-100.) az AFP, CEA és CA 19-9 tumormarker vizsgálatok eredményeit tüntettem fel a különböző betegcsoportokban.

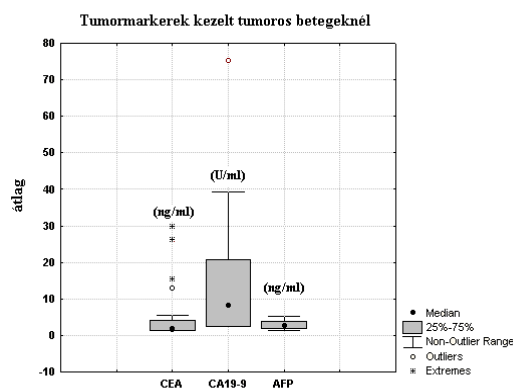
97. ábra



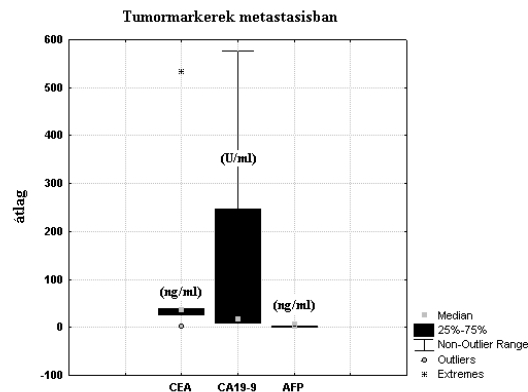
98. ábra



99. ábra



100. ábra



A tumormarkerek normálértékei: CEA: 0-4 (ng/ml); CA19-9: 0-37 (U/ml); AFP: (0-6n g/ml)

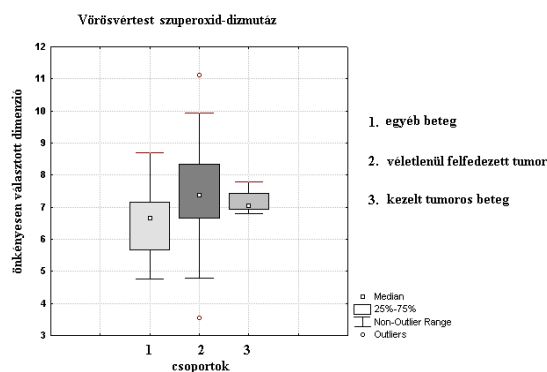
A tumormarkerek több esetben nem jelezték a tumor meglétét. Két esetben pedig ál-pozitív értéket kaptunk.

A SOD- és GSHPx-enzimaktivitások esetében nem kaptunk szignifikáns különbséget sem a kezelt és kezeletlen vizsgált tumoros csoportok, sem az egyéb betegek között. Ezek az értékek azonban megközelítően 10 %-kal alacsonyabbak voltak az egészségesek értékeinél. Az aktivitásokat önkéntesen választott egységekben adtuk meg, mert a vérből szeparált, és egységesen 1g/100ml hemoglobintartalomra beállított vörösvértestek lizátumának felulúszojából végeztük a mérést, párhuzamosan a kemilumineszcenciás vizsgálatokkal (101. és 102. ábra).

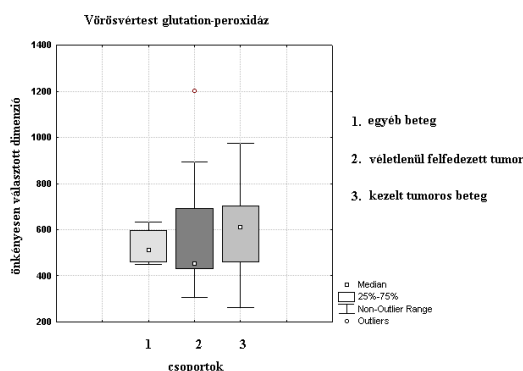
Megállapítottuk, hogy a kezeletlen (véletlenül felfedezett) tumoros betegek vörösvértest kemilumineszcenciás vizsgálati értéke minden esetben 150 % felett volt, míg a műtött, illetve kemoterápiában is részesülő betegeknél ez az érték 100 és 150 % között mozgott. Metasztázis esetében, a beteg elvesztése előtt néhány héttel, a vörösvértestek kemilumineszcenciás fényintenzitása az egészséges fiatal kontrollokénál is szignifikánsan kisebb értéket mutatott. A normálértéket 1000 mindkét nembeli vizsgált egyén adatainak kiértékelése után állapítottuk meg. Az 1000 emberből a nem dohányzó, semmilyen gyógyszert nem fogyasztó, és a rutin

laboratóriumi paraméterek (ALP, GOT, GPT, GGT, glükóz, TBIL, CHOL, TG, TP, húgysav, vérkép) alapján 30 egészséges fiatal felnőtt férfi és nő (életkor 25-35 év) esetében a vörösvértest-kemilumineszcencia $35 \% \pm 10$ RLU %-nak adódott. Sajnos az idősebb korosztályokban már csak elvétve találtunk 50 RLU %-nál kisebb értéket. A magukat egészségeseknek mondó (akut vagy krónikus betegségben nem szenvedő), általában dohányzó, de alkoholt rendszeresen nem fogyasztó felnőttekre akik különböző gyógyszereket is kaptak, a 60-70 RLU % érték volt jellemző.

101. ábra

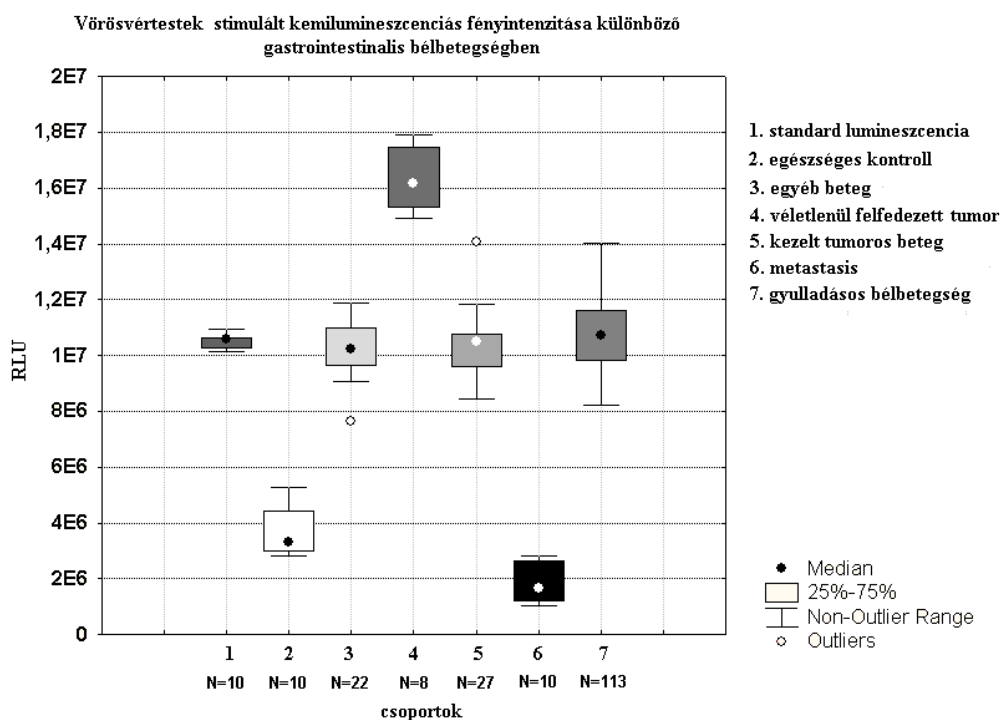


102. ábra

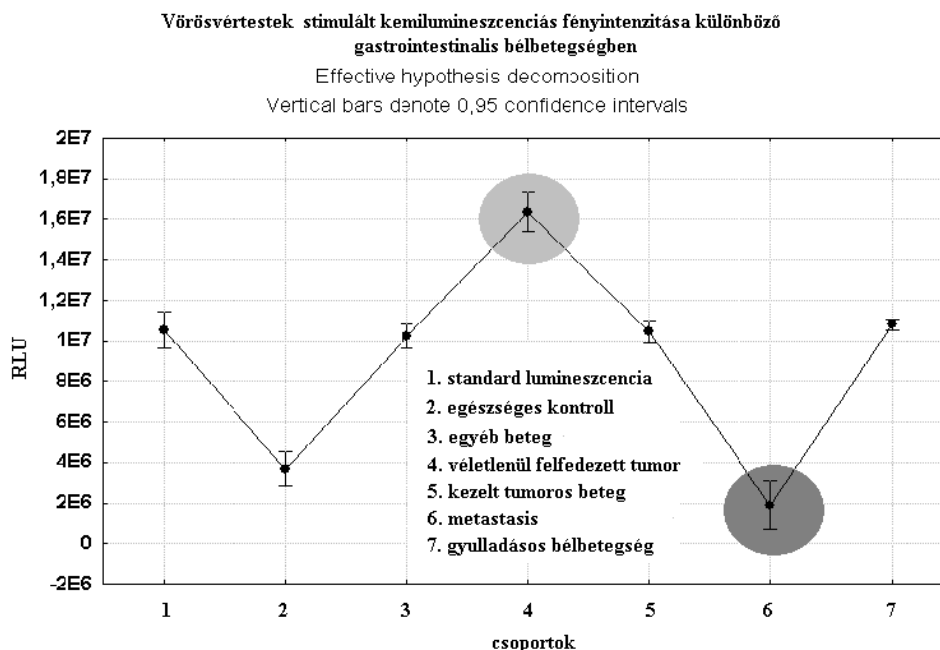


A 103. és 104. összefoglaló ábrákon különböző colontumoros betegek és súlyos állapotú IBD-ben szenvedők vörösvértestjeinek stimulált kemilumineszcenciás adatait tüntettem fel egészséges kontrollok és más, nem krónikus betegek adataival együtt.

103. ábra



104. ábra



A vizsgált szérum- és a redox-homeosztázist tükröző paraméterek közötti korreláció a tumoros betegek esetében volt a leggyengébb, ami arra enged következtetni, hogy a tumor növekedése, szóródása rendkívüli mértékben károsítja az antioxidáns védelem elemeit. A 23 kezelt tumoros beteg esetében a plazma-RLU vs epesavkoncentráció ($r = -0,47$), SOD- vs GSHPx-aktivitás között ($r = 0,47$) kaptunk csupán gyenge szignifikáns korrelációt ($p < 0,050$). Nem kaptunk sem a TAS, sem a vörösvértest-RLU értékekkel korrelációt, akár a tumormarkereket, akár a redox-homeosztázis elemeit vetettük egybe. A redoxiparaméterek közötti szoros korreláció Crohn-beteg nőkben erősebb volt, mint a férfiakban. Nőknél szoros korrelációt kaptunk a vörösvértest-SOD- és GSHPx-aktivitás ($r = 0,76$), plazma-kemilumineszcencia vs H-donor-aktivitás ($r = -0,73$) között. Férfiakban csak a SOD és a plazma-kemilumineszcencia között volt értékelhető gyenge kapcsolat ($-0,51$).

Következtetések

A vörösvértest kemilumineszcenciás vizsgálat eredménye alapján megállapítható, hogy különbséget tudunk tenni a colontumoros betegek különböző stádiumai között az antioxidáns kapacitás szempontjából. A 103. és a 104. ábrákból egyértelműen látszik, hogy a rosszindulatú daganat felfedezésekor szignifikáns, és más betegséggel össze nem téveszthető rendkívül intenzív szabadgyökös tevékenységet mértünk rendszerünkben, azaz, az össz-scavenger kapacitás kismértékű volt. A műtétet és kemoterápiát, vagy kemoterápiát és sugárkezelést is kapott betegek vörösvértest-kemilumineszcencia értékei nem különböznek szignifikánsan az egyéb, súlyos betegségben szenvedő páciensek vizsgálati eredményeitől. A halál előtti állapotban azonban a meglepően alacsony kemilumineszcencia érték háttérében az antioxidás

aktivitásokban, és a fémionok koncentrációviszonyainak alakulásában bekövetkező drasztikus változásokat kell keresnünk, mert a vizsgálati rendszer e paraméterekre érzékeny. E meglepően alacsony szabadgyök-szint okát azonban feltételezéseink szerint a vörösvértest protoporfirin-koncentrációja okozhatja. A protoporfirin ugyanis rendkívül jó hidroxilgyök- scavenger és így a mérőrendszerben nem gerjesztődik a luminol, következésképpen a fotomultiplier nem érzékeli az emittálódó fényt (Blázovics 2004d). A vizsgálatok e területen jelenleg is folynak.

4.4.4. Vizsgálatok májbetegségekben

A kilencvenes évek elején tatabányai kutatókkal közösen vizsgáltuk alkoholisták szabad gyök - antioxidáns státuszának megváltozását. Ebben az időben kezdtük el azoknak a kemilumineszcenciás vizsgálati módszereknek a kifejlesztését, amelyek már alkalmasak voltak klinikai rutinvizsgálatok elvégzésére. Ekkor CLD-1 luminométer (Medicor-Medilab) állt rendelkezésünkre. Később, a vállalat felszámolása miatt a készülék ellenőrzése és az alkatrészellátás megszűnt, így a vizsgálatokat Berthold Lumat 9501 készülékre kellett adaptálnunk. A két műszer felépítése és műszaki paraméterei közötti jelentős különbségek miatt azonban, csak a vizsgálatok statisztikai kiértékelése alapján a tendenciák voltak összevethetők a kontroll- és betegcsoportok között, az abszolút értékek nem, bár mindkét esetben „relative light unit” (RLU) egységben kaptunk meg a kemilumineszcencia mértékét.

E korai vizsgálatokban a teljes vér és a vörösvértest szabadgyök-scavenger tulajdonságát kutattuk alkoholfogyasztó egyéneknél, akik környezeti ártalmakat is elszenvedtek, vagy ismert alkohol- és gyógyszerkölcsönhatással kellett számolni. Vizsgálatainkba különböző stádiumú alkoholfogyasztó férfi- és nőbetegeket vontunk be. A betegeket a jellemző anamnézis, a klinikai és biokémiai kritériumok alapján csoportokba osztottuk. A betegeknél májbiopszia is történt. A luminometriás módszer alkalmasnak bizonyult arra, hogy különbséget tegyünk alkoholbetegek és alkoholfogyasztók + gyógyszereszedők májártalma, illetve a környezeti járulékos ártalmak szerepe miatt, az alkoholbetegek teljesvér össz-scavenger kapacitás-értékek között. Összefüggést találtunk a kemilumineszcenciás mérési eredmények és az alkoholos májbetegség súlyossága tekintetében is, bár ez nem volt minden esetben szignifikáns. A cirrhotikus betegek antioxidáns védekező képessége viszont szignifikánsan rosszabb volt az egészségesekénél. Amikor a vizsgált személyek klinikai-kémiai paramétereit és vérük fémtartalmát korreláltattuk a kemilumineszcenciás vizsgálat eredményeivel, azt kaptuk, hogy a legszorosabb korreláció a Cu/Zn arány és a GGT között volt. A szérumban A- és E-vitamintartalmának csökkenését jelezte a kemilumineszcencia fokozódása. E vizsgálatokkal párhuzamosan a vörösvértestmembrán diénkonjugátum-koncentrációkat is meghatároztuk. Azt találtuk, hogy az alkoholisták szérumban E-vitaminszintje korrelált leginkább a vörösvértestek diénkonjugátum-koncentrációival, míg a

betegségre jellemző enzimaktivitás értékek és a koleszterinszint között nem volt szoros kapcsolat. A csökkent E-vitaminszint mellett jelentős volt a membránkárosodás (Horváth 1992, 1992a, 1994, 1994-2000).

A műszer, és az ezzel együtt járó reagensváltást követően ismét tanulmányoztuk az alkohol redox-homeosztázist befolyásoló hatását zsírmájban, vagy nem dekompenzált cirrhosisban szenvedő alkoholisták plazmájában és vörösvértestjeiben. A diagnózis felállítása során ezekben az esetekben nem készült májbiopszia. A 32. táblázat a szérumparamétereket mutatja.

32. táblázat

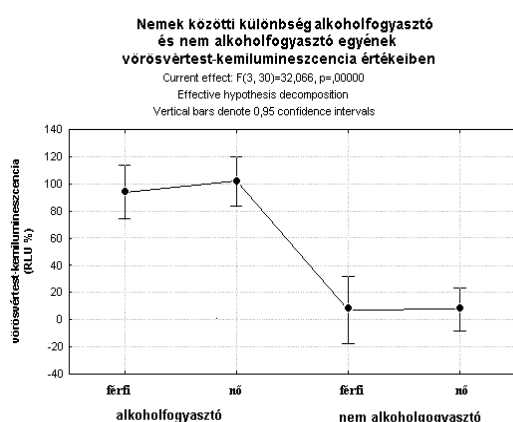
Alkoholos májbetegség laboratóriumi-paraméterei (átlag ± szórás)				
paraméterek	kontrollcsoport		alkoholos zsírmáj	
	férfi (n=16)	nő (n=16)	férfi (n=13)	nő (n=13)
életkor	47,8 ± 5,6	47,6 ± 8,2	51,1 ± 7,1	49,9 ± 8,4
TBIL	10,4 ± 2,4	9,4 ± 2,6	13,6 ± 4,0*	11,8 ± 6,5
CHOL	6,1 ± 0,1	6,0 ± 0,8	6,4 ± 0,8	5,7 ± 0,9
TG	1,8 ± 1,0	1,5 ± 0,7	2,8 ± 1,4	1,5 ± 0,6
húgysav	238,8 ± 78,9	176,9 ± 44,98	323,7 ± 92,55*	220,3 ± 63,41*
GOT	22,4 ± 1,68	20,1 ± 3,66	39,8 ± 13,36	27,1 ± 9,6
GPT	24,8 ± 5,8	18,7 ± 8,3	51,1 ± 17,3*	42,7 ± 26,8*
GGT	33,0 ± 8,4	25,0 ± 10,5	161,8 ± 78,3*	101,0 ± 42,6*
ALP	153,0 ± 22,8	165,5 ± 31,7	213,1 ± 55,0*	191,7 ± 44,6*
*szignifikáns (p<0,05) vs. ugyanolyan nemű kontrollegyenék;				

33. táblázat

A redoxistárust jellemző paraméterek alkoholos májbetegségben (átlag ± szórás)				
	kontrollegyenék		alkoholos zsírmáj	
	férfi (n=16)	nő (n=16)	férfi (n=13)	nő (n=13)
plazma szabad SH-csoport (mmol/l)	0,355 ± 0,022	0,352 ± 0,038	0,321 ± 0,034*	0,320 ± 0,033
plazma-redukálóképesség (mmol/eq AS)	1,04 ± 0,16	1,02 ± 0,09	1,32 ± 0,19*	1,13 ± 0,06*
plazma H-donor-aktivitás (%)	49,41 ± 3,09	46,09 ± 5,14	44,66 ± 3,9*	43,44 ± 2,81
plazma-kemilumineszcencia (RLU%)	2,57 ± 1,09	1,99 ± 1,37	4,00 ± 1,32*	8,16 ± 2,9*, **
vörösvértest-kemilumineszcencia (RLU%)	41,88 ± 19,84	39,43 ± 11,43	94,01 ± 31,22*	101,92 ± 31,81*
*szignifikáns (p<0,05) vs. ugyanolyan nemű kontrollegyenék;				
**szignifikáns (p<0,05) vs. férfi nem				

A redoxistatus vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy a plazma és a vörösvértest kemilumineszcenciás fényintenzitás a nőknél nagyobb volt, mint a férfiaknál a különböző betegcsoportokban. Ez az eredmény jól mutatta a női nem nagyobb érzékenységet az alkohollal szemben. A statisztikai kiértékelés során a plazmában a H-donor-aktivitás és redukálóképesség, illetve a H-donor-aktivitás és szabad SH-csoport között kaptunk szignifikáns korrelációt. A GGT a vörösvértest-kemilumineszcenciával korrelált ($p < 0,05$). Tehát a Bertholt Lumat 9501 készülékkel végzett vizsgálatok is alkalmasak voltak alkoholfogyasztók redox-homeosztázisának tanulmányozására. A 33. táblázatban a kontroll- és alkoholfogyasztó egyének redoxistatusát tükröző adatokat tüntettem fel (Hagymási 2001,002). Ha a vizsgáló rendszerben a vörösvértest-

105. ábra



koncentrációt háromszorosára (0,0015 g/100ml hemoglobintartalom) növeltük, akkor még nagyobb különbséget tudtuk kimutatni az alkoholfogyasztók és nem alkoholfogyasztók vörösvértest gyökfogó kapacitása között. (A magasabb RLU érték gyengébb gyökfogó kapacitást jelent.) (105. ábra)

Betegek

A betegeket az anamnézis, a klinikai és biokémiai kritériumok alapján alkoholfogyasztó ($n=26$; életkor: $51,2 \pm 9,5$) (alkoholos zsírmáj) és nem alkoholos zsírmájú ($n=28$; életkor: $49,4 \pm 10,8$) csoportokba osztottuk. A kontrollok életkorban hasonló önkéntesek voltak ($n=32$; életkor: $47,6 \pm 8,2$).

Az igazoltan alkoholos májbetegségben szenvedők napi alkoholfogyasztása férfiak esetében meghaladta az 50, nők esetében a 30 g-ot. Az alkoholos májbetegség stadiumának pontos szövettani diagnózisához májbiopsziára van szükség, de a jelen vizsgálatban ennek elvégzését nem tartottuk szükségesnek, sem etikailag megengedhetőnek.

Célkitűzés

A fentebb vázolt előzmények után, ebben a vizsgálatban arra voltunk kíváncsiak, vajon kapunk-e különbséget a nem alkoholos és alkoholos eredetű májbetegség redox-homeosztázisának kemilumineszcenciás vizsgálatakor.

Eredmények

A 34. táblázatban a nem alkoholos zsírmájban (NASH) és az alkoholos zsírmájban (ASH) szenvedők jellemző rutin laboratóriumi paramétereit tüntettem fel.

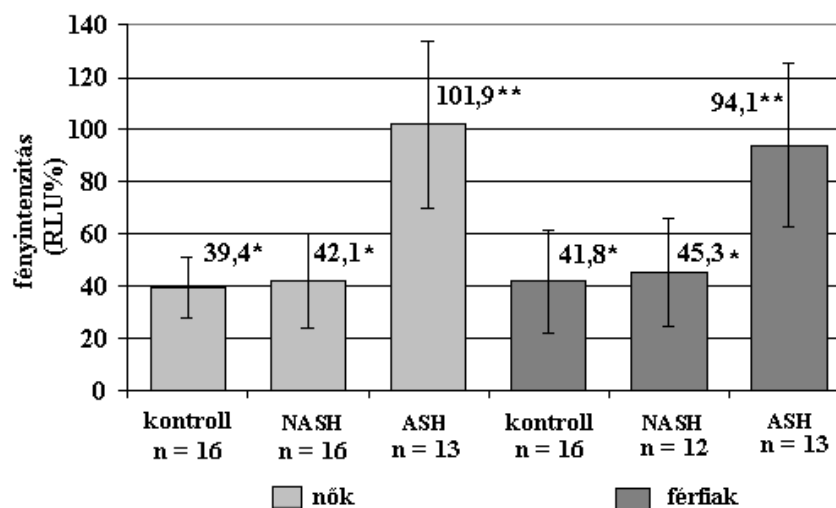
34. táblázat

Alkoholos zsírmájban és nem alkoholos zsírmájban szenvedők laboratóriumi paraméterei (átlag $\pm$ szórás)			
paraméterek	kontroll (n = 32)	nem alkoholos zsírmáj (n = 28)	alkoholos zsírmáj (n = 26)
TBIL	10,4 $\pm$ 1,49 *	10,3 8 $\pm$ 3,8 *	52,5 $\pm$ 8,75 **
CHOL	3,24 $\pm$ 0,56 *	5,42 $\pm$ 0,8 **	12,8 $\pm$ 4,5 ***
TG	0,81 $\pm$ 0,28 *	1,84 $\pm$ 0,9 **	2,25 $\pm$ 1,4 ***
húgysav	246,0 $\pm$ 32,2 *	342,03 $\pm$ 59,1 **	272,5 $\pm$ 58,1 ***
GPT	14,41 $\pm$ 2,4 *	46,96 $\pm$ 20,7 **	49,2 $\pm$ 18,6**
GOT	13,4 $\pm$ 2,58 *	39,55 $\pm$ 18,5 **	39,8 $\pm$ 13,4**
ALP	158,2 $\pm$ 22,8 *	208,77 $\pm$ 46,3 **	223,4 $\pm$ 62,2 ***
GGT	13,2 $\pm$ 4,3 *	78,29 $\pm$ 57,3 **	152,3 $\pm$ 73,5 ***
szignifikánsan (p<0,05) eltérő értékeket, különböző számú * jelzi			

A 106. ábra nemek szerinti csoportosításban mutatja az alkoholos és a nem-alkoholos zsírmájban a vörösvértest össz-scavenger kapacitás átlagértékeit. A nőknél szignifikánsan magasabb fényintenzitást mértünk az alkoholos eredetű zsírmájban, mint a férfiaknál. A kétféle betegségben eltérő mértékű volt a kemilumineszcencia intenzitása az alkalmazott rendszerben.

106. ábra

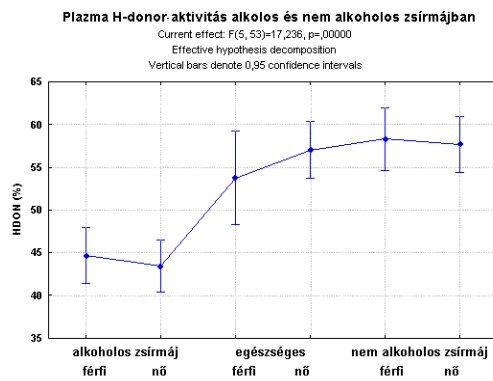
Vörösvértestek össz-scavenger kapacitásának változása
alkoholos és nem alkoholos májkárosodásban



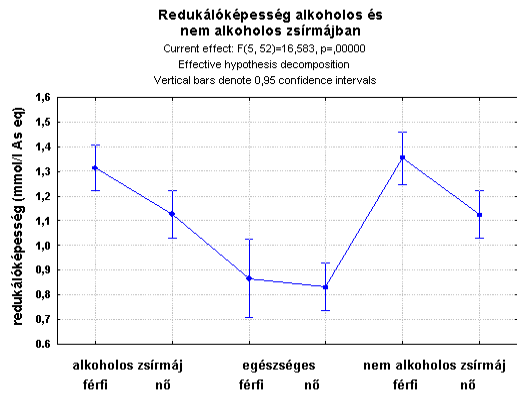
(A szignifikanciát (p< 0,05) különböző számú *- jelöli.)

A H-donor-aktivitás (107. ábra) és redukálóképesség (108. ábra) vizsgálatoknál szintén jól látható a szignifikáns különbség a kétféle zsírmájban. A NASH-betegek esetében tapasztalt kedvezőbb redox-homeosztázis jól egyezik az irodalmi adatokkal (Kocsis 2004, Blázovics 2004b, Hagymási 2004).

107. ábra



108. ábra



Az alábbi két táblázatban (35., 36.) a redoxiparaméterek közötti szoros korrelációt gyűjtöttük össze.

35. táblázat

Redox-homeosztázist meghatározó szignifikáns kapcsolatok a plazmában			
Különbségek a nemek között			
alkoholos zsírmáj ($p<0,05$)		nem alkohos zsírmáj ($p<0,05$)	
nő	férfi	nő	férfi
Fe-húgysav $r=0,88$	RED-húgysav $r=0,82$	RED-húgysav $r=0,72$	RED-húgysav $r=0,98$
Fe-CHOL $r=-0,96$	HDON-CHOL $r=0,76$	RED-HDON $r=0,88$	RED-HDON $r=0,90$
	Fe-ALP $r=-0,87$	HDON-húgysav $r=0,67$	HDON-húgysav $r=0,94$
		PLRLU-Fe $r=-0,85$	plRLU-Fe $r=-0,87$
			plRLU-CHOL $r=-0,88$

RED = plazma-redukálóképesség; HDON = plazma H-donor-aktivitás; plRLU = plazma-kemilumineszcencia; CHOL = szérumkoleszterin

36. táblázat

Redox-homeosztázist meghatározó szignifikáns kapcsolatok		
alkoholos zsírmáj ($p<0,05$)	egészséges ($p<0,05$)	nem alkohos zsírmáj ($p<0,05$)
RED-húgysav $r=0,81$	RED-húgysav $r=0,95$	RED-húgysav $r=0,88$
RED-HDON $r=0,56$	RED-HDON $r=0,85$	RED-HDON $r=0,58$
plSH-HDON $r=0,78$	RED-plRLU $r=-0,77$	HDON-húgysav $r=0,67$
GGT-vvtRLU $r=0,62$	plRLU-vvtRLU $r=0,98$	GOT-vvtRLU $r=0,65$
	plSH-vvtRLU $r=-0,99$	GPT-vvtRLU $r=0,65$
	plRLU-HDON $r=0,66$	GGT-vvtRLU $r=0,70$

RED = plazma-redukálóképesség; HDON = plazma H-donor-aktivitás; plSH = plazma szabad-SH csoport; vvtRLU = vörösvértest-kemilumineszcencia; plRLU = plazma-kemilumineszcencia

Következtetések

A vörösvértest össz-scavenger kapacitás meghatározása felhasználható az alkohos májbetegség progressziójának követésére, valamint az antioxidáns terápia hatásosságának megítélésére. Antioxidáns kezelések tervezésénél a redoxistatusz eltolódásait azonban mindenképpen figyelembe kell venni. Eredményeink felvetik az alkoholfogyasztás következményeként

kialakuló nemtől függő oxidatív stressz lehetőségét a kialakuló máj- és szisztémás károsodásokban, mert az ugyanolyan mértékű alkoholfogyasztás nőkben kifejezettebb oxidatív stresszt, illetve májkárosodást okoz.

A NASH-ban szenvedő betegek és alkoholisták luminometriás vizsgálati eredményei közötti különbség szignifikánsnak adódott (Horváth 1992, 1992a, 1994, 1994/2000, Hagymási 2001, 2004, Blázovics 1999, 2004, 2004b).

4.5. Az esszenciális és toxikus fémionok biokémiai reakciói

A táplálkozással, tápszerekkel, élelmiszerkiegészítőkkel szervezetünkbe jutó „aktív” komponensekről, és azok kölcsönhatásairól a fémionokkal, ill. az esszenciális és toxikus fémionok (környezetszennyezés, természeti katasztrófák, háborús pusztítás) kölcsönhatásairól a különböző betegségekben keveset tudunk.

A szervezet számára toxikus, a ritka földfémekhez tartozó elektrofil tulajdonságú fémionok, mint pl. a Cd és Hg nagy affinitással kötődnek a fehérjék nukleofil szabad SH-csoportjaihoz, míg az átmeneti tulajdonságú ólom inkább a $-NH_2$, $=NH$; aril-OH és $=O$ csoportokat részesíti előnyben. Az Pb ionos kölcsönhatás révén kötődik pl. csatornafehérjékhez is. Hidroxilapatitba épülve a csontokban halmozódik fel.

A Cr, Fe, Ni, Cu, Zn ionok szulfhidrilcsoportokkal alkotnak komplexeket (Hayat 1996). A Cd, Hg és Pb kanalikuláris transzportja feltételesen a GSH exkrécióját okozza (Blázovics 2002).

Az egészséges szervezetben az esszenciális fémionok koncentrációja szigorúan meghatározott, míg a toxikus fémionok metabolizmusa a szervezetben gyengén szabályozott, és kiürülésük lassú. A máj jelentős szerepet játszik a nehézfémionok detoxikálásában. A nehézfémek akkumulációja nagy koncentrációban gátolja az enzimaktivitásokat, befolyásolja az akut fázis fehérjék szintézisét és a génexpressziót. A nehézfémionok, mint pl. a Ni és Cr növelik a $TNF-\alpha$, az IL-1 és IL-6 szintjét, aktiválják a proteinkináz C-t. A Zn, Cu, Cd, Mn és Ni modulálni képes a tumorsuppresszor p53-at, ezáltal befolyásolja az apoptózist. Az IL-6 szabályozza a metallothionein expresszióját és a Zn akkumulációját. A DNS-javítórendszer érzékeny a Ni- és Cr-ionokra, következésképpen megnő a tumorképződés rizikója. A Cr és a Ni kiszorítja a Zn-et a DNS-repair enzimek „Zn ujjából”. A Zn és Cu hiánya következtében nő a szérumkoleszterin- és triglicerid szintje. A Ni kiüríti a glutationraktárakat, a toxikus Cr viszont oxidációs számot vált a szervezetben (Chen 1998, Debacker 2001, Gelagutashvili 1997, Goebeler 1993, Hayat 1996, Higinbotham 1992, Kernohan 1996, Kong 1998, Schulze-Osthoff 1997, Wagner 1997, Wildman 2001).

A Fe és a Zn létfontosságú nyomelemeink az Pb-hoz hasonló reakcióba lépnek átmeneti tulajdonságú nukleofil csoportokkal és a fehérjék szabad SH-csoportjaival is. A Zn több mint

300 enzim alkotórésze, és így szerepet játszik a szénhidrát-, lipid-, fehérje- és nukleinsav-anyagcserében (Dainty 2001). A Fe többek között az oxigenázok, oxidázok, peroxidázok, kataláz, hidrolázok, szignálmolekulákat szintetizáló enzimek komponense. Mindkét elem befolyásolja a szervezet redox-homeosztázisát. A vastoxicitás a Fe(II)-höz kapcsolható, mert a Fenton-reakcióban $\cdot\text{OH}$ szabad gyök képződik, mely NO-dal peroxinitrilt képez. Gyulladásos bélbetegségekben, daganatos betegségekben a malnutritio miatt lecsökken a szervezet fémionkoncentrációja. A Zn és a Cu szintje szoros kapcsolatban van a hematológiai paraméterekkel. (Chukhlovin 2001, Clopton 1997, Czauderna 1989, Horváth 2001, Jacobson 1985, RDA 1989).

4.5.1. Toxikus fémionterhelés hatása a májszövet és az epe

lipidperoxidációs paramétereire

Az esszenciális fémionok (Cu, Fe, Mn, Zn) homeosztázisa szoros kontroll alatt van a szervezetben, míg a nem esszenciális nehézfémionok metabolizmusa gyengén szabályozott és kiürülésük lassú (Mercer 1991, Theocharis 1991). A májnak kitüntetett szerepe van a fémionok anyagcseréjében és a detoxikálásban. A fémes elemek megoszlása a különböző szövetekben eltérő (Feltelius 1988, Lacka 1997). A Hg-, Pb- és Cd-toxikózis leginkább a májat és a veséket terheli (Debacker 2001, Gelagutashvili 1997, Stohs 1995, Wagner 1997). A Hg szintje különösen magas lehet a májban, amíg az Pb inkább a csontokban halmozódik fel, bár eloszlása egyenletes a szövetek között. A Cd inkább a vesékben akkumulálódik. A máj felveszi a fémionokat a keringésből, metabolizálja, tárolja és újra elosztja, egyrészt az epébe, másrészt a keringésbe juttatja vissza.

A fémionok mozgása az epe és a plazma között elsődlegesen transzcellulárisan történik (Blázovics 2002). Az elemek paracelluláris útja és duktulális szekréciója elhanyagolható. Intracellulárisan fehérjékhez kötődnek, és főleg a metallothionein játszik indirekt szerepet a transzmembrán fluxban. A fémionok mozgása a májsejtmembránon keresztül leginkább facilitált diffúzióval, adszorpcióval és receptormediált módon endocitózis/exocitózis formájában valósul meg (Clopton 1997, Blázovics 2002).

A egy- és kétértékű fémionok epébe történő szekréciója transzportrendszerekkel történik. (Clopton 1997). A legtöbb fém excreciója az epébe az epe/plazma koncentrációgrádiens függvénye.

Célkitűzés

A környezetszennyezés miatt a táplálékláncon keresztül súlyos, toxikus fémionterhelés érhet bennünket. A toxikus fémionok májkárosító hatása nem kellően ismert. Korábbi

vizsgálatainkban már igazolást nyert, hogy az epekőképződésben fontos szerep jut a szabadgyök-reakcióknak. A toxikus elemek gyökgeneráló képessége miatt feltételezhető volt, hogy a fémionterhelés szignifikánsan megnöveli mind a máj, mind az epe szabadgyök-szintjét. A kérdés az volt, hogy a különböző fémionok milyen mértékben károsítják a májat, és milyen mértékben módosítják az epében folyó redoxireakciókat.

Kutatásaink során húscsirkékben vizsgáltuk a Cd, Pb és Hg koncentrációfüggő májkárosító hatását, a máj és az epe szabadgyök-paramétereinek változását, a redox-homeosztázist és a metabolikus utak gátlását követő morfológiai változásokat.

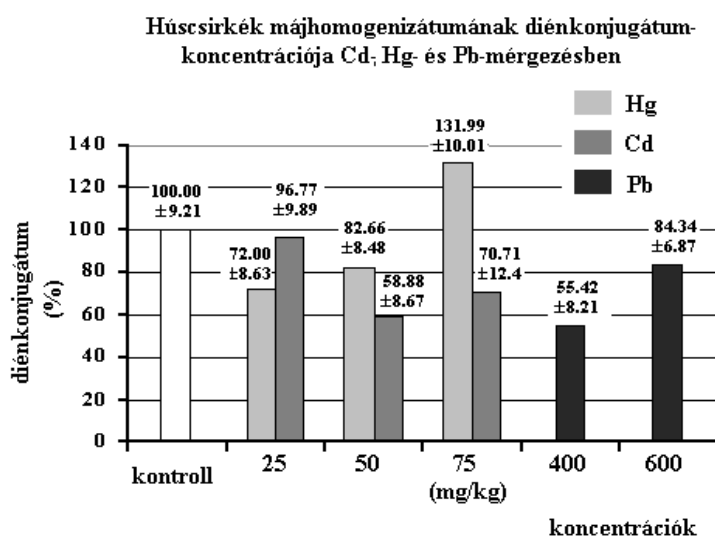
Kísérleti körülmények

A húscsirkéket alaptápra kevert 25, 50, 75 mg/kg kadmiummal (CdCl_2), 25, 50, 75 mg/kg higannyal (HgCl_2) és 400, 600 mg/kg ólommal ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) ad libitum kezeltük egyhetes koruktól hathetes korukig.

Eredmények

A máj diénkonjugátum-koncentrációja kisebb volt az Pb-mal és Cd-mal kezelt állatokban, mint a kontrollcsoportban, ugyanakkor a 75 mg/kg dózisú Hg-kezelés szignifikánsan növelte a diénkonjugátumok koncentrációját (109. ábra).

109. ábra



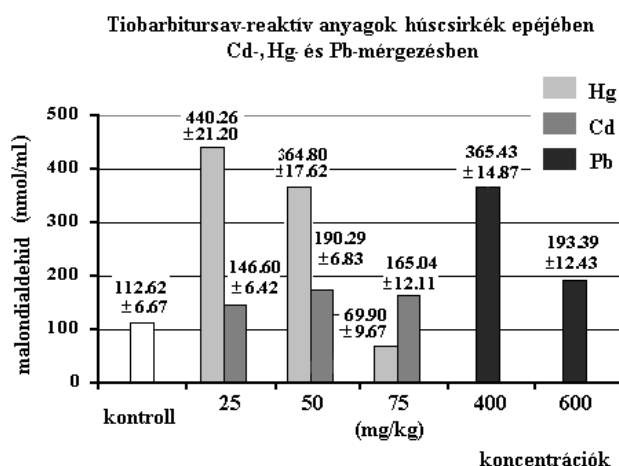
A Cd-mérgezés hatása eltért az Pb- és Hg-mérgezésektől. Az epében a MDA koncentrációja inkább a Hg- és Pb-kezelt állatokban volt nagy, míg a Cd csak enyhe fokú változást okozott (110. ábra).

Inverz profil mutatkozott a máj diénkonjugátum- és az epe MDA-koncentrá-

ciója között. A csökkent MDA-tartalom az epében a toxikus elemek nagyobb koncentrációinál megerősíti azok epekőképződésben való részvételét, mivel az epék viszkozitása megnőtt (110. ábra) (Sípos 2003).

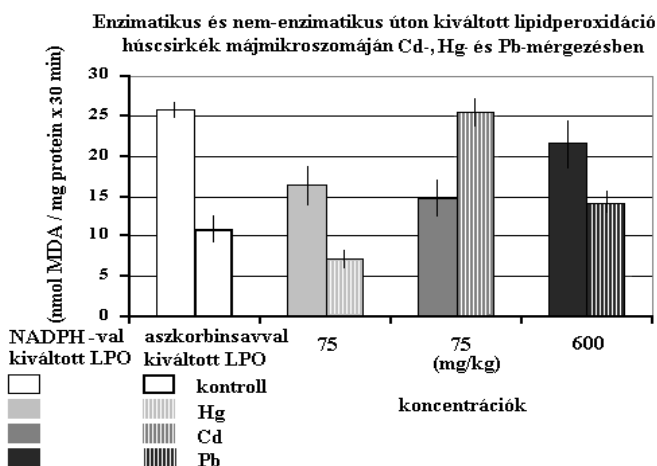
A kemilumineszcenciás fényintenzitás növekedése, melyet RLU %-ban adtunk meg a máj természetes antioxidáns védekezésének károsodását igazolta.

110. ábra



A TBA-reaktív anyagok koncentrációja szignifikánsan kisebb volt a Hg-kezelés következtében az aszkorbinsavval kiváltott LPO során, mint a Cd és az Pb mellett, tekintettel arra, hogy a májszövetből eltűntek a lipidcseppek, és a morfológiai kép a cirrhosisba hajló elváltozást mutatta.

112. ábra

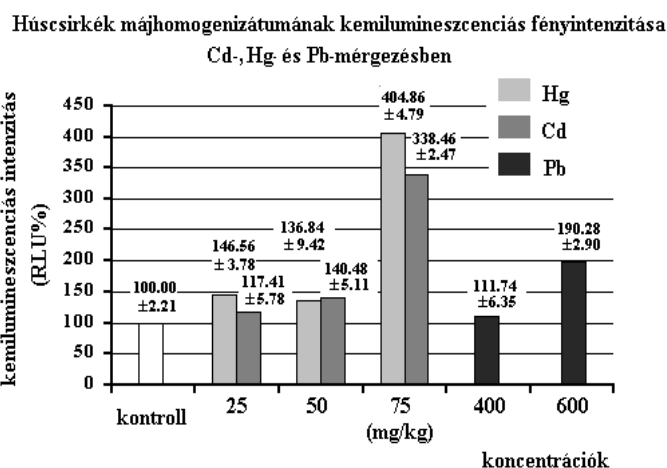


szignifikánsan rosszabb eredményeket adtak, mint az Pb (600 mg/kg) nagyobb dóziséval kiváltott mérgezés.

A 113. ábrán a májmetszetek fénymikroszkópos képe látható a különböző, dóziszfüggő kezelések hatására (A,B,C,D). A hisztológiai vizsgálatok a 25 mg/kg Hg- és Cd-, valamint a 400 mg/kg

A legrosszabb gyökfogó képesség a 75 mg/kg dózisú HgCl_2 -kezelésnél mutatkozott. Az Pb bizonyult a legkevésbé ártalmasnak a májban (111. ábra). Ezek az adatok jól korreláltak a májmikroszómákban mért enzimatis és nem enzimatis úton in vitro kiváltott lipidperoxidáció eredményeivel (112. ábra).

111. ábra



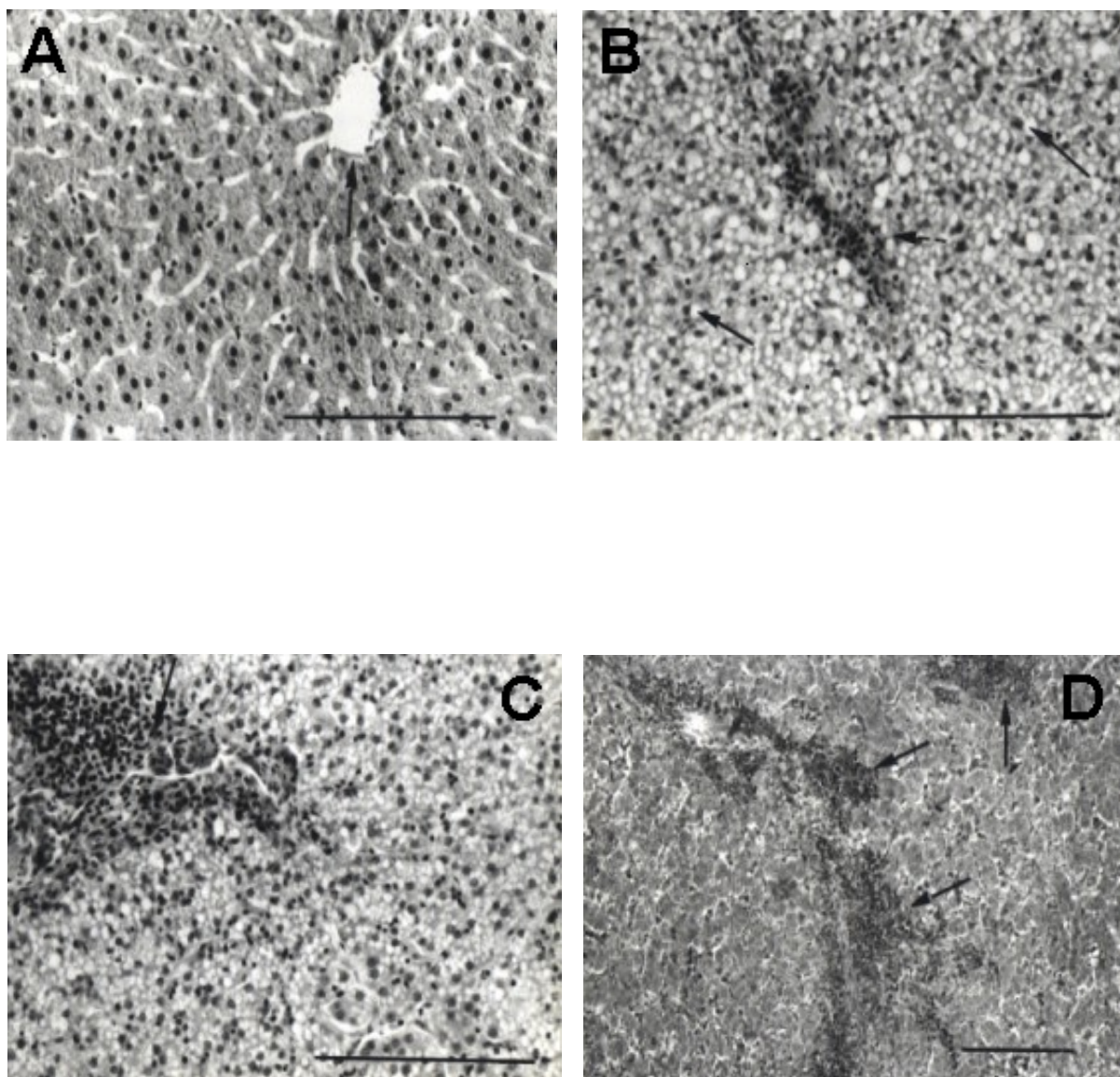
Mindhárom kezelés károsította a májsejtek normális funkcióját, ezért a membrán-kötött NADPH-citokrómmal c-reduktáz csökkent aktivitása miatt a NADPH-kiváltott peroxidáció a mérgező fémionok dóziséval függően gátlódott (112. ábra). A HgCl_2 - és CdCl_2 -kezelések (75 mg/kg)

dózisú Pb-kezelés során limfocitainfiltrációt igazoltak, a 75 mg/kg dózisú Hg-kezelés súlyos periportális gyulladáshoz vezetett, melyből cirrhosis alakulhat ki. Az Pb (600 mg/kg) és a Cd (75mg/kg) legnagyobb koncentrációi szintén gyulladáshoz vezetnek, bár kisebb mértékben, mint a Hg.

113. ábra

**Broiler csirkék májszövetének fénymikroszkópos képe
Cd-, Hg- és Pb-mérgezésben**

A: kontroll; B: 600 mg/kg Pb; C: 75 mg/kg Cd D: 75 mg/kg Hg



- A: Kontrollállatból származó májlobulus centrális része. A nyíl a centrális vénát mutatja.
 B: Ólommal kezelt csirkék májlebenye. A nyílak a lipidcseppeket, a szaggatott nyíl a gyulladásos reakciókat jelzi.
 C: A májlebeny perifériális része zsírájban kadmium-kezelés után. A nyíl az infiltrált területet mutatja.
 D: A májlebeny egy része higannyal kezelt csirkékben. A nyíl a gyulladásos területeket mutatja. (nagyítás=100 μ m)

Következtetések

Kísérleti adataink felhívják a figyelmet arra, hogy a táplálékláncon keresztül toxikus fémionok kerülhetnek szervezetünkbe, melyek súlyos májkárosodást is okozhatnak. A nehézfémionok jelentősen fokozzák a máj és az epe lipidperoxidációs reakcióit. A lipiperoxidáció végtermékei carcinogén vegyületek (Blázovics 2002).

4.5.2. Toxikus elemek dúsulása zsírmájban, patkányokban

Az átmenetifémionok ubiquitous tulajdonságúak biológiai rendszerekben, mert kulcsszerepet játszanak a redoxifolyamatok katalizálásában. A szervezet számára a két legfontosabb „redoxiaktív” ion, a Fe és a Cu, részt vesz a reaktív szabad gyökök képződésében. A metalloproteinek, mint pl. a CuZnSOD a citoplazmában és a magban, az MnSOD a mitokondrium mátrixban, a Fe-tartalmú kataláz a peroxiszómákban és a citoplazmában biztosítják az enzimatikus antioxidáns védelmet. Az egészséges szervezetben ezeknek az fémeknek egymáshoz viszonyított aránya szabályozott. (Mercer 1991, Biesel 1996, Kimura 1996, Isfaoum 1997, Lacka 1997, Siegel 1999, Broska 2000, Szentmihályi 2000, 2004a). Számos vegyület, mint például az alkoholok, toluol, abnormálisan lecsökkentik a Zn koncentrációját a májban, viszont a Cu koncentrációja megnövekedik a vesékben. (Dominicus 1992). A Zn hiánya karakterisztikusan megváltoztatja a lipidmetabolizmust, mert Zn-hiányban nő a koleszterin-, foszfolipid- és trigliceridkoncentráció a HDL-, LDL- és VLDL-frakciókban n-3 zsírsavakban bő diéta mellett (Eder 1994). Bizonyos fémionok, mint például a Cr és a Cu túlzott felvétele a DNS-károsodások miatt immunszuppressziót indukál, és csökken a limfoid sejtek túlélése. Kísérletesen igazolták, hogy a Ni fokozza a tumorképződési hajlamot (Siegel 1999, Theocharis 1991). A túlzott mértékű Zn és Cd gátolja az apoptózist (Chukhlovin 2001). A Cd mind a májban, mind az epében fokozza a lipidperoxidációt (Blázovics 2002). Az IL-6 akut fázis fehérje szabályozza a metallothionein génexpresszióját és a hepatociták Zn-akkumulációját patkányban (Schroeder 1990).

A réz kötődése a hepatikus és renális metallothioneinhez védőmechanizmusként működik, mert emiatt a megkötött fémionok képtelenek bármilyen citosztatikus aktivitást kifejteni (Czauderna 1989, Debacher 2001).

Célkitűzés

A civilizáció káros hatása következtében egyre több a helytelen táplálkozás miatt steato-hepatitisban szenvedő ember. A fémion-homeosztázis módosulása nem ismert zsírmájban. A kísérletsorozattal egyfelől azt kívántuk tanulmányozni, hogy van-e különbség általában a máj fémion-homeosztázisban normolipidaemiában és hyperlipidaemiában, másfelől, hogyan módosul a szervezetben a toxikus fémionok koncentrációja a májban és az epében.

Kísérleti körülmények

Kísérletünkben hím Wistar patkányokat 12 napig kezeltünk zsírdús diétával (2 % koleszterint, 0,5 % kólsavat (CA) vagy dezoxikólsavat (DCA) és 20 % napraforgóolajat adtunk a táphoz). 10 állat kontrolltápot, 10 állat DCA- és 10 állat CA-kiegészítésű zsírdús tápot kapott.

Eredmények

Az antioxidáns enzimek működését aktiváló elemek, a Zn-Mn és a Zn-Cu között szoros pozitív korrelációt találtunk a normolipidaemiás egészséges patkányok esetében. A Ni és Cr között viszont negatív korreláció volt. Hyperlipidaemiás állatokban további szoros pozitív korreláció jelentkezett a Cu-Fe és a Cu-Cr között. A Fe-, Zn-, Cu- és Mn-tartalom nem szignifikáns csökkenését és a Ni- és Cr-koncentrációk növekedését detektáltuk zsírmájban “short term” kísérletben. Szignifikánsan megnőtt a Fe- és a Ni-, és nem szignifikánsan a Zn-koncentráció az epében.

Azt tapasztaltuk, hogy patkányokban a toxikus elemek a májban halmozódtak és az epével jelentősen ürültek alimentáris eredetű hyperlipidaemiában.

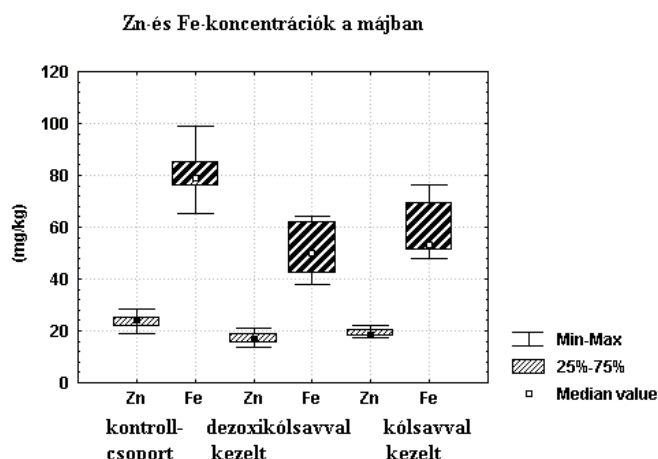
A 37. táblázatban a kontroll és zsírdús diétával kezelt csoportokban mért fémionkoncentrációk közötti pozitív és negatív korrelációkat tüntettem fel. Mindhárom csoportban szoros pozitív korreláció volt a Zn és a Mn koncentrációja között, míg a Zn- és a Cu-koncentráció közötti szignifikáns pozitív korreláció a dezoxikólsavas kezelésnél a Zn-Fe-ra változott, a kólsavkezelésnél pedig Cu és Fe közötti párhuzamos kapcsolat mutatkozott szignifikánsnak. A Ni toxicitását jelzi az is, hogy a kólsavval kezelt hyperlipidaemiás patkányokban csökkentette a Mn-koncentrációt. Negatív korrelációt találtunk a Fe- és Cu-ionok koncentrációja között az epében dezoxikólsavas kezelésnél hyperlipidaemiás patkányokban ($r=-0,988$; $p<0,05$).

37. táblázat

Az elemek koncentráció-viszonyainak változása a patkánymájban		
csoportok (n=10)	pozitív korreláció	negatív korreláció
kontrollcsoport	Zn-Mn ($r=0,9542$; $p=10^{-4}$) Zn-Cu ($r=0,9500$; $p=0,001$)	Ni-Cr ($r=-0,8570$; $p=0,014$)
dezoxikólsavval kezelt hyperlipidaemiás csoport	Zn-Mn ($r=0,6430$; $p=0,045$) Zn-Fe ($r=0,7721$; $p=0,009$)	-
kólsavval kezelt hyperlipidaemiás csoport	Zn-Mn ($r=0,9456$; $p=0,015$) Cu-Fe ($r=0,9694$; $p=0,045$) Cu-Cr ($r=0,6257$; $p=0,039$)	Ni-Mn ($r=-0,6546$; $p=0,040$)

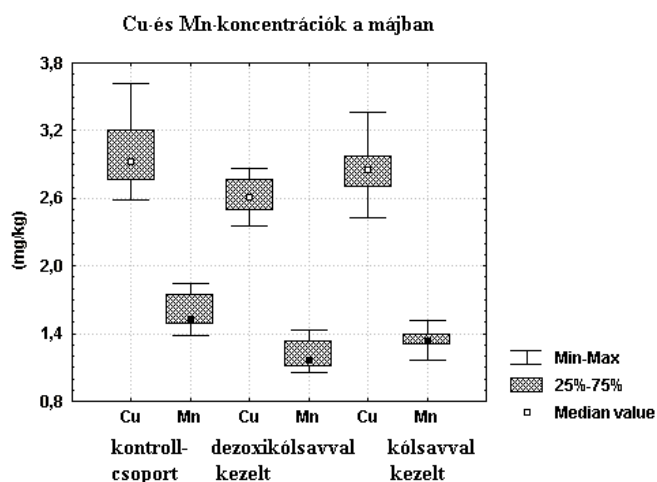
A 114.-117. ábrákon az elemkoncentrációk alakulása látszik normo- és hyperlipidaemiás állatokban a kétféle epesavkezelés mellett. Szignifikáns különbség mutatkozik a Fe- és Ni-koncentrációkban a kezelések során. A Ni halmozódása következtében a vas koncentrációjának csökkenése figyelhető meg.

114. ábra



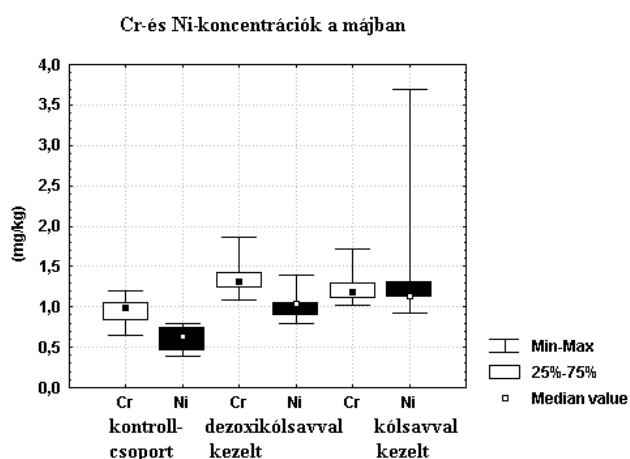
A Fe-, Zn- és a Cu-koncentráció nagyobb mértékű csökkenése volt megfigyelhető a dezoxikólsavval kezelt hyperlipidaemiás állatokban.

115. ábra

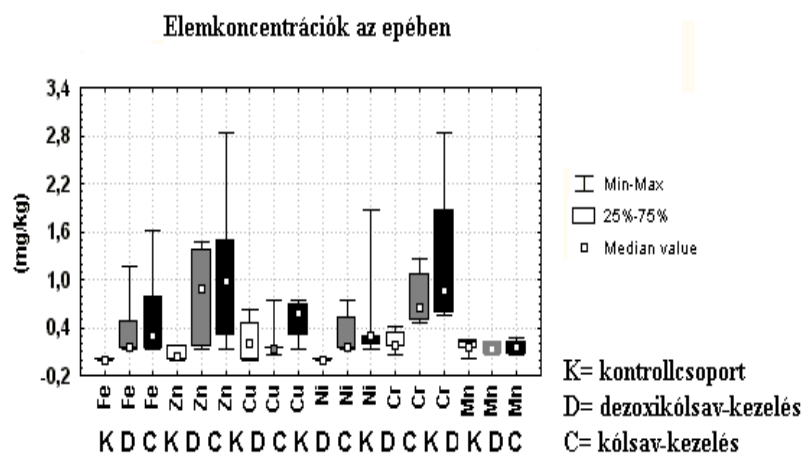


A Zn-, Cu- és Mn-koncentrációkban a 12 napos diéta során még nem alakult ki szignifikáns csökkenés, de a tendencia egyértelmű.

116. ábra



A Mn koncentrációja szintén kedvezőtlen változást mutatott a kezelések miatt. A Cr- és Ni-koncentrációk növekedtek zsírmájban.

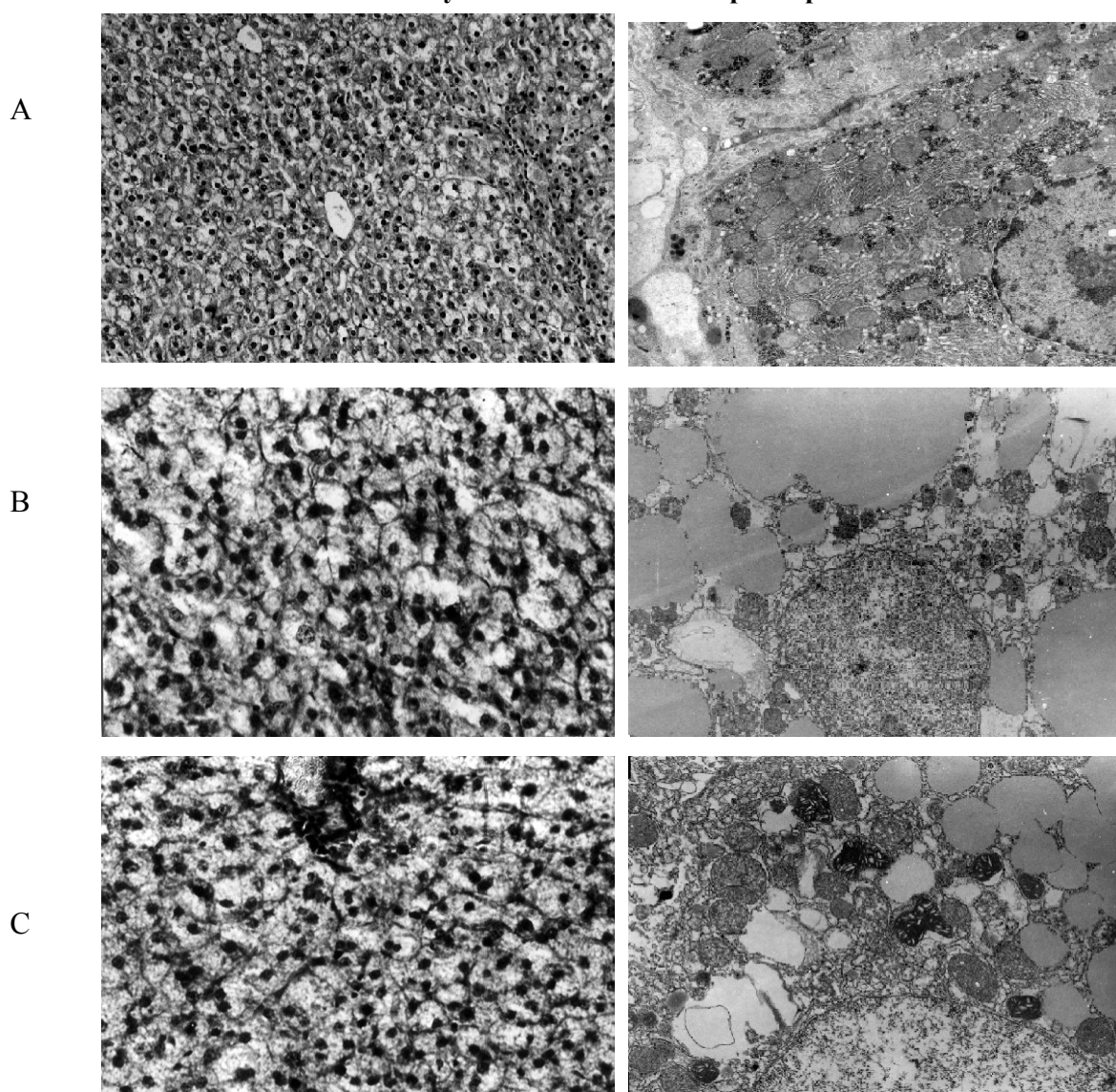


117. ábra

Az összes vizsgált elemet nagyobb koncentrációban találtuk a hyperlipidaemiás patkányok epéjében, mint a kontrollcsoportban. Szignifikánsan nőtt a Fe és Ni, és nem szignifikánsan a Zn mennyisége az epében a kezelések során.

118. ábra

Fény- és elektronmikroszkópos kép



A: kontrollmáj

B: dezoxikólsavval kezelt hyperlipidaemiás patkányok mája

C: kólsavval kezelt hyperlipidaemiás patkányok mája

Következtetések

A kutatások eredményei alapján azt feltételezzük, hogy az elhízott emberek esetében nagyobb valószínűséggel jelentkező vastagbél-tumороk kialakulásához a májban halmozódó és az epével ürülő toxikus fémionok hozzájárulnak a szabadgyökös folyamatok felerősödése, a lipidperoxidáció és a következményes MDA képződés miatt is.

4.5.3. A Beiqishen tea fémiontartalmának hatása normo- és hyperlipidaemiás patkányok fémionháztartására

Epidemiológiai vizsgálatok bizonyítják, hogy a megfelelő vitamin- és nyomelembevitel javítja az immunrendszer működését és az élefunkciókat. Számos esetben tapasztaltuk, hogy a gyógyteák és kivonatok fémionösszetétele jelentősen módosíthatja azok élettani hatását (DRI 2002, Szentmihályi 1999, Blázovics 2003a 2004a) A teák fogyasztása pótolhatja, vagy kiegészítheti napi ásványianyag-igényünket.

A vas létfontosságú fémion, melyet naponta 10-15 mg mennyiségben szükséges fogyasztani. A vassupplementáció azonban csak igazolt vashiányos állapot esetén engedhető meg. A Fe felszívódásához és a hemoglobin képződéséhez jelenlegi tudásunk szerint Cu-re, Zn-re, Mn-ra és Co-ra is szükség van. A Cu túlzott bevitele idegi tüneteket, magas vérnyomást és arhythmia-t is okozhat. A Zn szöveti koncentrációjának 35 %-os csökkenése a prosztata megnagyobbodását, 66 %-os csökkenése a prosztata rákos megbetegedését idézi elő. A limitált mennyiségű Cr a glükóz-koleszterin- és zsírsav-metabolizmusban hasznosul. A Mn fokozza a táplálékhasznosulást. Újabb megfigyelés szerint kedvezően hat a morfinelvonás tüneteinek csökkentésében (Nechifor 2003). Megfigyeltük, hogy a termőhelyek talajának szennyezettsége szignifikánsan befolyásolhatja a gyógynövények minőségét, ezáltal közvetlen veszélyt jelenthetnek a fogyasztóknak (Szentmihályi 2003, 2003a, 2004). Ismert, hogy a legtöbb mikroelem oldhatósága a talaj savasodásával növekszik. A Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Sr, Zn, stb. kationt képző nyomelemek koncentrációja savterhelés hatására a talajoldatban több nagyságrenddel is nőhet. Az aniont képző elemek (As, Mo, Se) koncentrációja a savas talajoldatban elhanyagolható (Bíró 1999). Kabata Pendias 1992, Kukurenda 1982, Mengel 1976, Pais 1980, 1984, PansarKallio 1997, Tölgyesi 1969).

A kilencvenes években többször beszámoltak arról, hogy bizonyos kínai eredetű „fogyasztó” teák súlyos vesekárosodásokat okoztak, melyek gyakran végzetes kimenetelűek voltak (Jadoul 1993, Vanherweghem 1993, But 1993, Gartner 1993).

Célkitűzés

A hazánkban is kapható Beiqishen tea (Beiqishen Healthy Food Co Ltd.) széles körű felhasználhatóságának igazolására in vivo patkánykísérletben tanulmányoztuk, hogy a tea hatóanyagai (*Astragalus mongolicus*, *Ganoderma lucidum*, *Lycium barbarum*, *Camellia sinensis*) és fémiontartalma hogyan befolyásolja a máj redukálóképességét, H-donor-aktivitását, a máj össz-scavenger kapacitását és gyökgeneráló képességét. (Lásd a 4.1.2. fejezetet!)

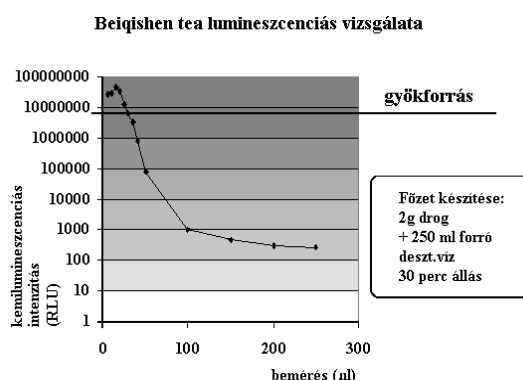
Kísérleti körülmények

A kísérlet során kontroll és zsírdús tápon tartott 150-200 g-os hím Wistar patkányokat ad libitum kezeltünk 14 napig, napi 2g teadrog/ttkg-nak megfelelő 30 perces forrázattal. A normo- és hyperlipidaemiás teával kezelt és kezeletlen csoportokban, csoportonként 10-10 állat volt.

Eredmények

A tea szabadgyök-scavenger kapacitásának in vitro vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy az elkészített ital tovább hígítva gerjesztette a vizsgáló rendszerben a luminolt annak ellenére, hogy gyengébb H-donor-aktivitást és redukálóképességet mértünk. A luminol-dependens kemilumineszcencia vizsgálatoknál jelentkező fokozott gyökgeneráló hatás a fitokémiai és elemanalízis eredményeinek ismeretében vált értelmezhetővé. A hígítás során ugyanis egyre csökkent az antioxidáns molekulák mennyisége a mérési rendszerben, viszont még mindig volt jelen annyi fémion, amennyi elegendő volt ahhoz, hogy katalizálni tudja a hidrogénperoxid bomlását a Fenton-típusú reakcióban, és ezzel lehetővé tegye a luminol $\rightarrow$ aminoflalat átalakulást. A fényintenzitás csak akkor csökkent ismét, amikor a fémionkoncentráció is elérte a rendszer szempontjából kritikusán alacsony értéket. A 119. ábrán a kemilumineszcenciás fényintenzitás-változást mutatom be a tea hatására $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}$ -luminol-mikroperoxidáz rendszerben.

119. ábra



A 38. táblázatban a Beiqishen teadrog és a vizes kivonat elemkoncentrációi, valamint a kioldódási ráta látható.

A nem várt toxikus elemek szignifikánsan nagy koncentrációja miatt felvetődött a kérdés, vajon a Beiqishen tea hogyan fejti ki hatását a májra. A tea fogyasztása befolyásolja-e a májenzimek

aktivitását, ill. a metabolitok koncentrációját a patkányok szérumban? Ha eltérést tapasztalunk a szérumparaméterekben, akkor annak mi lehet az oka? Megjelenik-e a tea toxikus elemeinek bármelyike is a májban? A tea komponensei hatással vannak-e a máj redox-homeosztázisára?

Következő lépésként meghatároztuk a májszövetek elemtartalmát. A teával kezelt egészséges patkányok májában szignifikánsan nőtt a Fe, a Mn és nem szignifikánsan a Ca szintje, míg a többi esszenciális fémion koncentrációja gyakorlatilag nem változott. A májban megjelent az As, Co, Mo és Ni a Beiqishen tea fogyasztása következtében. A toxikus elemek koncentrációja a nem teázott csoportokban a kimutatási határ alatt volt (39. táblázat).

38. táblázat

A Beiqishen teadrog (mg/kg) és a tea vizes kivonatának (mg/l) elemkoncentrációja és a fémionok kioldódási rátája (%)					
elemek	Beiqishen teadrog (mg/kg)		Beiqishen teakivonat (mg/l)		kioldódási ráta (%)
	átlag	szórás	átlag	szórás	
Al	17,13	199	5,62	0,23	30,38
As	10,17	2,77	< 0,003		
B	12,90	0,73	0,136	0,01	97,29
Ba	28,43	0,71	0,081	0,004	19,80
Ca	6460	372	17,4	0,48	24,55
Cd	< 0,1		< 0,003		
Co	0,775	0,083	0,0035	0,0014	42,06
Cr	3,29	0,58	0,0058	0,0029	16,41
Cu	21,32	0,25	0,0607	0,0089	26,36
Fe	395,5	79,4	0,136	0,010	3,19
Hg	< 0,5		< 0,0013		
K	19233	2391	159,2	5,7	76,60
Li	< 0,15		< 0,0004		
Mg	2252	57	14,65	0,05	60,21
Mn	1129	172	4,40	0,08	36,09
Mo	< 0,05		< 0,0001		
Na	287,6	45,1	2,65	0,2	85,19
Ni	6,77	0,58	0,0636	0,0041	86,85
P	2468	44	14,54	0,56	54,50
Pb	< 1,33		< 0,015		
S	3315	55	16,80	0,35	46,88
Ti	11,13	0,86	0,0019	0,0006	1,59
V	< 0,25		< 0,006		
Zn	37,22	4,45	0,144	0,0035	35,68

A tea a hyperlipidaemiás állatok májában szignifikánsan csökkentette az As-, Mo-, Ni-, Pb- és növelte a Mg-, P-, S- és Zn-koncentrációt a hyperlipidaemiás kontrollokhoz képest. Valószínűsíthető, hogy e hatás hátterében a tea bioaktív hatóanyagai, és a zsírmájban kimutatható fokozott szabadgyökös terhelés, valamint a nekrozissal együttjáró citokinmintázat játszott szerepet, amely beindította a Zn-függő metallotioneinek szintézisét, azaz egy kompenzatórikus utat. Ennek indirekt bizonyítéka a Mg-, P-, S- és Zn-koncentrációk növekedése

a májban. Mivel a tea toxikus elemei továbbra is terhelték a máj méregtelenítő rendszerét, a nekrozis nem volt megállítható. (Lásd a 2.1.5. és a 4.5. fejezetet!)

39. táblázat

Beiqishen tea hatása az elemkoncentrációk változására (májhomogenizátumban) ($\mu\text{g/g}$)					
elemek	normolipidaemia	normolipidaemia + tea	hyperlipidaemia	hyperlipidaemia + tea	szignifikancia $p < 0,05$
As	$< 0,150$	$0,427 \pm 0,152$	$0,438 \pm 0,281$	$0,358 \pm 0,101$	sz.
Ca	$27,78 \pm 12,41$	$31,38 \pm 3,70$	$30,23 \pm 3,33$	$28,29 \pm 11,44$	n.sz.
Co	$< 0,015$	$0,0484 \pm 0,0097$	$0,216 \pm 0,027$	$0,0487 \pm 0,0054$	sz.
Cr	$0,103 \pm 0,024$	$0,084 \pm 0,033$	$0,156 \pm 0,013$	$0,091 \pm 0,018$	sz.
Cu	$2,03 \pm 0,22$	$2,14 \pm 0,12$	$2,10 \pm 0,11$	$2,13 \pm 0,17$	n.sz.
Fe	$37,84 \pm 8,41$	$52,83 \pm 11,26$	$34,24 \pm 12,86$	$39,71 \pm 12,90$	n.sz.
K	4672 ± 198	4588 ± 125	4515 ± 126	4405 ± 174	n.sz.
Mg	$258,7 \pm 11,9$	$254,1 \pm 8,4$	$238,5 \pm 14,2$	$392,3 \pm 36,5$	sz.
Mn	$0,995 \pm 0,113$	$1,161 \pm 0,172$	$1,113 \pm 0,125$	$1,314 \pm 0,258$	sz.
Mo	$< 0,025$	$0,353 \pm 0,157$	$0,215 \pm 0,022$	$0,202 \pm 0,061$	sz.
Na	$201,9 \pm 12,2$	$209,5 \pm 3,1$	$116,2 \pm 14,2$	$152,4 \pm 22,9$	sz.
Ni	$< 0,025$	$0,212 \pm 0,132$	$1,270 \pm 0,073$	$1,078 \pm 0,057$	sz.
P	2034 ± 65	2021 ± 28	1876 ± 41	3405 ± 157	sz.
Pb	$< 0,150$	$< 0,150$	$0,436 \pm 0,055$	$< 0,150$	n.sz.
S	1531 ± 135	1457 ± 96	1288 ± 124	2322 ± 123	sz.
Zn	$16,11 \pm 3,17$	$16,71 \pm 2,48$	$14,86 \pm 1,51$	$26,89 \pm 8,41$	sz.
ANOVA „one way analysis” (Graph Pad softwer, version: 1.14)					

40. táblázat

Szérumparaméterek alakulása Beiqishen tea hatására normo- és hyperlipidaemiás patkányokban ($\text{átlag} \pm \text{szórás}$)				
csoportok (n=10)	ALP (U/l)	GPT (U/l)	GOT (U/l)	GGT (U/l)
kontrolltáp	$785,2 \pm 88,9$	$53,4 \pm 12,2$	$192,4 \pm 95,47$	$1,75 \pm 0,96$
zsírdús táp	$1861,0 \pm 239,9$	$78,2 \pm 47,9$	$162,3 \pm 42,0$	$2,25 \pm 1,89$
kontrolltáp+tea	$710,0 \pm 63,8$	$53,2 \pm 14,7$	$156,0 \pm 55,0$	$1,66 \pm 0,57$
zsírdústáp+tea	$1756,6 \pm 381,7$	$124,3 \pm 46,2$	$201,0 \pm 62,5$	$2,66 \pm 0,57$
szignifikancia $p < 0,05$	1 vs 2 sz.	1 vs 2 n.sz.	1 vs 2 n.sz.	1 vs 2 n.sz.
	1 vs 3 sz.	1 vs 3 n.sz.	1 vs 3 n.sz.	1 vs 3 n.sz.
	1 vs 4 sz.	1 vs 4 sz.	1 vs 4 n.sz.	1 vs 4 sz.
	2 vs 3 sz.	2 vs 3 n.sz.	2 vs 3 n.sz.	2 vs 3 n.sz.
	2 vs 4 n.sz.	2 vs 4 sz.	2 vs 4 n.sz.	2 vs 4 n.sz.
	3 vs 4 sz.	3 vs 4 sz.	3 vs 4 n.sz.	3 vs 4 sz.

A 40. - 42. táblázatokban a szérumparaméterek értékei láthatók. Hyperlipidaemiában a szignifikánsan rossz májenzimértékek nem javultak a tea fogyasztásra. ebben a „short term” kísérletben. Az GPT, GOT, GGT értékekben nem volt szignifikáns eltérés a tea-kezelésre egyik diétás csoportban sem. A tea csak normolipidaemiában csökkentette szignifikánsan az ALP

értéket. Néhány mért paraméter (GPT, CHOL, TBIL, BUN) értéke pedig nem szignifikáns mértékben romlott mindkét diéta mellett.

41. táblázat

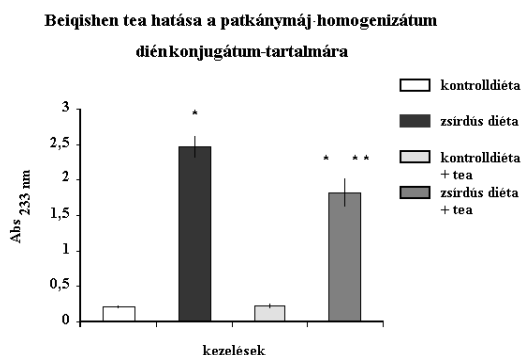
Szérumparaméterek alakulása Beiqishen tea hatására normo- és hyperlipidaemiás patkányokban (átlag $\pm$ szórás)				
csoportok (n=10)	CHOL (mmol/l)	TG (mmol/l)	GLU (mmol/l)	AMY (U/l)
kontrolltáp	1,876 $\pm$ 0,253	2,078 $\pm$ 0,797	12,76 $\pm$ 8,81	2909 $\pm$ 826
zsírdús táp	7,144 $\pm$ 1,431	0,690 $\pm$ 0,135	9,73 $\pm$ 1,21	2341 $\pm$ 284
kontrolltáp+tea	2,056 $\pm$ 0,282	1,432 $\pm$ 0,519	19,17 $\pm$ 9,73	3100 $\pm$ 310
zsírdústáp+tea	8,010 $\pm$ 1,920	1,209 $\pm$ 0,889	14,77 $\pm$ 9,37	2498 $\pm$ 174
szignifikancia p<0,05	1 vs 2 sz.	1 vs 2 sz.	1 vs 2 n.sz.	1 vs 2 n.sz.
	1 vs 3 n.sz.	1 vs 3 n.sz.	1 vs 3 n.sz.	1 vs 3 n.sz.
	1 vs 4 sz.	1 vs 4 sz.	1 vs 4 n.sz.	1 vs 4 n.sz.
	2 vs 3 sz.	2 vs 3 sz.	2 vs 3 sz.	2 vs 3 sz.
	2 vs 4 n.sz.	2 vs 4 sz.	2 vs 4 n.sz.	2 vs 4 n.sz.
	3 vs 4 sz.	3 vs 4 n.sz.	3 vs 4 n.sz.	3 vs 4 sz.

Irodalmi adatok szerint a húgysavszint növekedése szoros korrelációt mutat a redukálóképesség, illetve a szöveti antioxidáns tulajdonság növekedésével. Eredményeink alapján azonban úgy tűnik, hogy ez a hatás nem jutott érvényre a fémionterhelés miatt. A redox-homeosztázis vizsgálatkor azt tapasztaltuk, hogy a teával itatott normolipidaemiás állatok májában nem nőtt a diénkonjugátum-tartalom (121. ábra), de romlott az össz-scavenger kapacitás. A hyperlipidaemiás állatokban kisebb volt a diénkonjugátum-koncentráció a tea fogyasztására, ami azonban még nem bizonyítja a tea jótékony hatását (122. ábra).

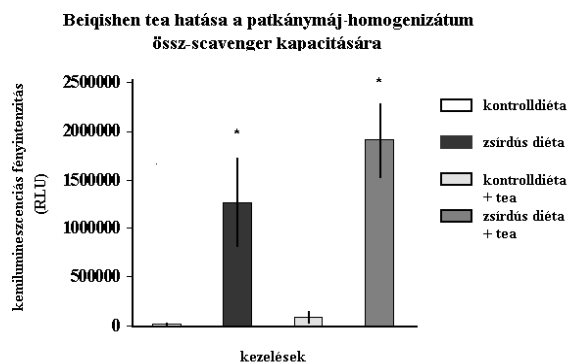
42. táblázat

Szérumparaméterek alakulása Beiqishen tea hatására normo- és hyperlipidaemiás patkányokban (átlag $\pm$ szórás)				
csoportok (n=10)	TBIL (μ mol/l)	UA (μ mol/l)	BUN (mmol/l)	CRE (μ mol/l)
kontrolltáp	2,40 $\pm$ 0,54	107 $\pm$ 11	4,27 $\pm$ 0,15	37,8 $\pm$ 7,01
zsírdús táp	3,40 $\pm$ 2,70	152 $\pm$ 41	3,30 $\pm$ 0,96	50,4 $\pm$ 10,2
kontrolltáp+tea	2,40 $\pm$ 0,54	364 $\pm$ 219	4,46 $\pm$ 0,63	49,2 $\pm$ 8,2
zsírdústáp+tea	4,66 $\pm$ 2,08	363 $\pm$ 340	6,06 $\pm$ 1,44	47,6 $\pm$ 1,8
szignifikancia p<0,05	1 vs 2 n.sz.	1 vs 2 sz.	1 vs 2 sz.	1 vs 2 sz.
	1 vs 3 n.sz.	1 vs 3 sz.	1 vs 3 n.sz.	1 vs 3 sz.
	1 vs 4 sz.	1 vs 4 sz.	1 vs 4 sz.	1 vs 4 sz.
	2 vs 3 n.sz.	2 vs 3 sz.	2 vs 3 sz.	2 vs 3 n.sz.
	2 vs 4 n.sz.	2 vs 4 n.sz.	2 vs 4 sz.	2 vs 4 n.sz.
	3 vs 4 sz.	3 vs 4 n.sz.	3 vs 4 sz.	3 vs 4 n.sz.

121. ábra

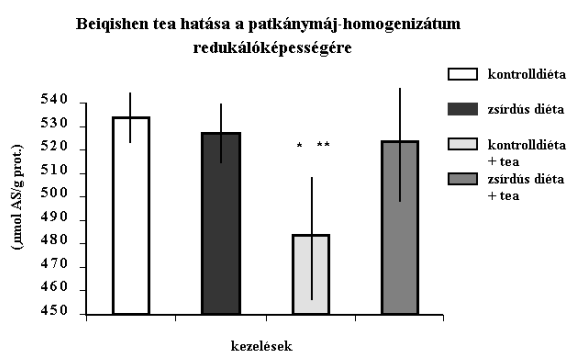


122. ábra

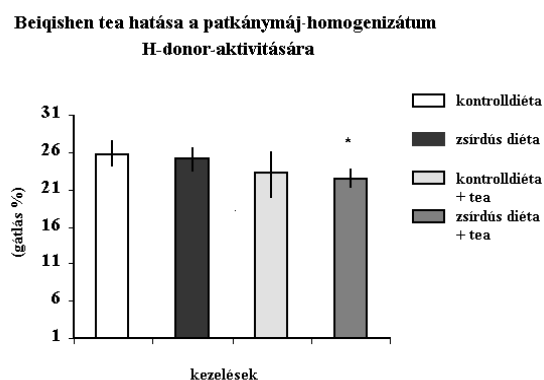


A 122. ábrán feltüntetett szignifikánsan magas RLU értékek a teával kezelt csoportok májában a felerősödő szabadgyök-képződést jelzik. Ezzel párhuzamosan minimálisan csökkent a redukálóképesség a normolipidaemiás teával kezelt állatokban, viszont nőtt a hyperlipidaemiás teával itatott patkányok májában (123. ábra). A H-donor-aktivitás enyhe csökkenést mutatott mindkét kezelt csoport esetében (124. ábra). A * és a ** a szignifikanciát jelöli: * vs kontroll; **vs zsírmáj.

123. ábra



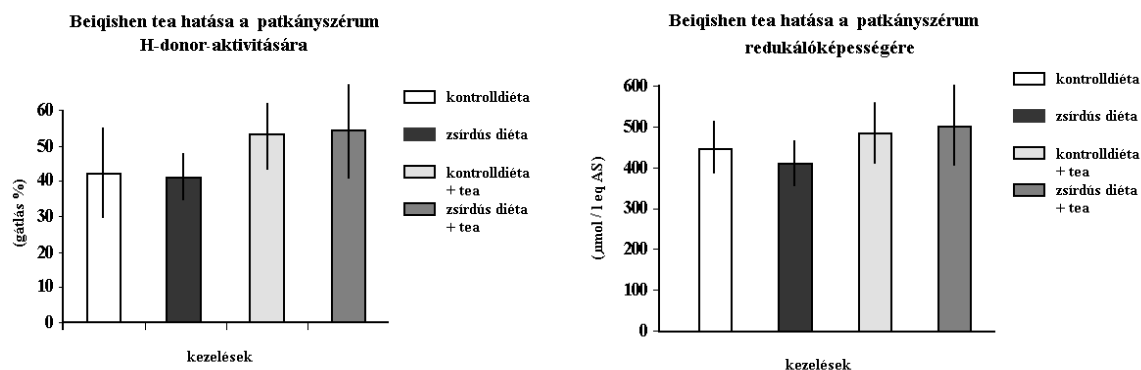
124. ábra



A patkányok szérumában egyik kezelés sem okozott szignifikáns eltérést a redukálóképességben és a H-donor-aktivásban a „short term” kísérlet alatt (125.,126. ábrák).

125. ábra

126. ábra



A tea elemkoncentrációival kapcsolatban megállapítható, hogy a Ni-koncentráció ($64 \mu\text{g}/\text{l}$) káros lehet tartós fogyasztás során emberben is (RDA 1989, DRI 2002). A Ni koncentrációjának megengedett értéke napi $80 \mu\text{g}$ és a tea fogyasztása ezt megduplázhathatja. A tolerálható legnagyobb napi Ni-mennyiség 1 mg lehet, ami az általunk készített tea napi 15 literében található. Ennyi teát bizonyára nem fogyasztunk, de szignifikáns eltéréseket mutathat a Ni koncentrációjának megadása, ha rossz szokás szerint a teafilter egész nap ázik poharunkban. A Mn kritikus elem lehet a toxicitás szempontjából, mert napi tolerálható mennyisége 11 mg , és ez kevesebb, mint 3 liter általunk vizsgált tea fogyasztását engedi meg naponta. E fejezetben nem tárgyaljuk a lehetséges szinergista és antagonisták kölcsönhatásokat a tea egyéb komponensei és a gastrointestinalis tractus szövetei között (Blázovics 2003, 2003b, 2004a).

Következtetések

Ezek az eredmények arra hívják fel a figyelmet, hogy a nem megfelelő minőségű és/vagy ismeretlen összetételű gyógynövénykészítmények túlzott mértékű fogyasztása súlyos egészségkárosodást okozhat. A gyógyteák a gyógyszerekhez hasonlóan limitált mennyiségben és időtartamban fogyaszthatók egészségkárosodás nélkül.

4.5.4. A Zn-túladagolás hatása a vasanyagcserére gyulladásos bélbetegségekben

IBD-ben, colitis ulcerosában és Crohn-betegségben az antioxidáns védekező mechanizmus aktivitása összefüggésben a nyomelemstátusszal függ a vérzések gyakoriságától, a bél permeabilitásától. A nyomelemek hiánya kedvezőtlenül befolyásolja az immunrendszer fejlődését és működését (Chandra 1999, Jacobson 1985, Szczurek 2001). Az optimális Cu-koncentráció a vérben pozitívan befolyásolja a komplementrendszer aktiválódását. A Zn hasonlóan szignifikáns befolyást gyakorol az immunrendszerre. A Zn és a Cu koncentrációviszonyai jelentősen befolyásolják a vérképzést IBD-ben (Dalekos 1998). Amíg a vörösvértest Zn-státuszában nem találtak különbséget, addig a plazmában már jelentkezett kismértékű eltérés colitis ulcerosában (Ainley 1988). A Zn verseng a Ca-mal is. Az IBD-ben szenvedő betegekben

gyakori az osteopenia és osteoporosis (Roth 1998, Ghos 2000). A normális redox-homeosztázis érdekében az antioxidáns védelemhez nélkülözhetelen vitaminok és d-mező elemek pótlása mellett szükséges a Ca, K, Mg, Na pótlása is (Tominaga 1989, Failla 1999, Van de Wal 1993).

Célkitűzés

Mivel IBD-ben a belek permeabilitása megváltozik, megváltozhat a fémionok abszorpciója is. Ezért arra voltunk kíváncsiak, vajon találunk-e eltérést a remisszióban lévő betegek vérének elemkoncentrációiban, találunk-e különbséget a plazma és vörösvértest antioxidáns paramétereinek aktivitásában, az egészségesekhez viszonyítva adekvát terápia és táplálékkiegészítés mellett.

Kísérleti körülmények

A vizsgálatba bevontak a kaukázusi rasszhoz tartoztak: 8 önkéntes (4 nő; 4 férfi) átlagéletkor: $33,62 \pm 13,83$ (átlag $\pm$ szórás) és 12 inaktív IBD-ben szenvedő beteg (9 nő; 3 férfi) átlagéletkor: $44,65 \pm 15,68$. A betegség fennállásának átlagideje: $17,09 \pm 10,76$ év.

Az összes beteg azonos terápiában részesült: 5-ASA 3-4 g/nap. 8 betegnek Nutridrink kiegészítést adtunk (Numil Kft.). Egy beteg napi 3 tabletta Polyvitaplexet (Richter Gedeon Rt.) + 3000 U D3-vitamint (Sanofi-Chinoin) + 500 mg kalciumot/Calcium-Sandoz (Novartis) + és háromhavonta 1000 gamma B12-vitamint (Richter Gedeon Rt) szedett. Egy másik páciens heti 2×100 mg Fe-at (2 tabletta Sorbifer durules EGIS) + napi 500 mg kalciumot és 1 Nutridrink készítményt + háromhavonta 1000 gamma B12-vitamint kapott. A harmadik betegnek napi 5 mg folsavat (Huma-Folacid / Humanpharma) és 2 Nutridrink készítményt + háromhavonta 1000 gamma B12-vitamint adtunk. A negyedik betegnek napi 1 Nutridrink készítmény + napi 9 g Questran (cholestiramine) (Bristol-Myers Squibb) + D3-vitamin (3000 U) + háromhavonta 1000 gamma B12-vitamin volt szükséges.

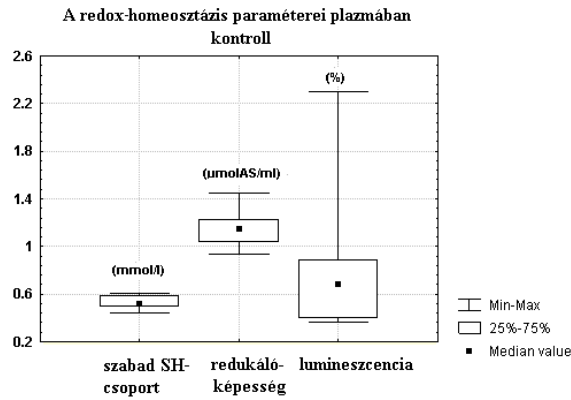
Minden beteg esetében rutin laboratóriumi- és abdominális ultrahangvizsgálatra került sor. A betegek a megfelelő betegtájékoztató után a szérumparaméterek és az általános állapot ismeretében (Best- és CU-indexek szerint) lettek a kutatási projektbe bevonva.

Eredmények

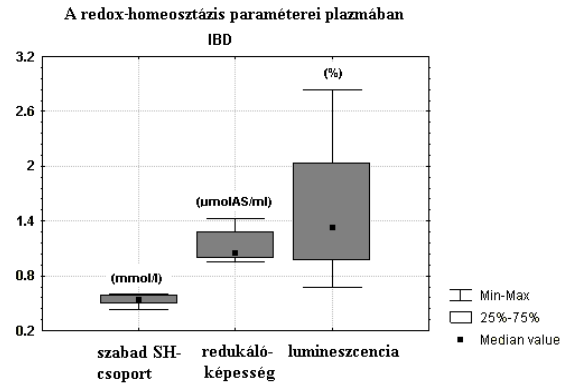
A 127.-130. ábrákon a plazma redoxiparamétereit, a szabad SH-csoportok koncentrációját, a redukálóképességet és a luminol-függő kemilumineszcenciát tüntettem fel önkéntes kontrollok és remisszióban lévő IBD-ben szenvedők esetében. A mért paraméterek értékeiben nem találtunk szignifikáns eltéréseket. A plazma H-donor-aktivitásában enyhe különbség jelentkezett a betegek kárára. A betegek vörösvértestjeiben azonban már jelentős károsodás volt megfigyelhető az egészségesekhez viszonyítva (130. ábra).

127. ábra

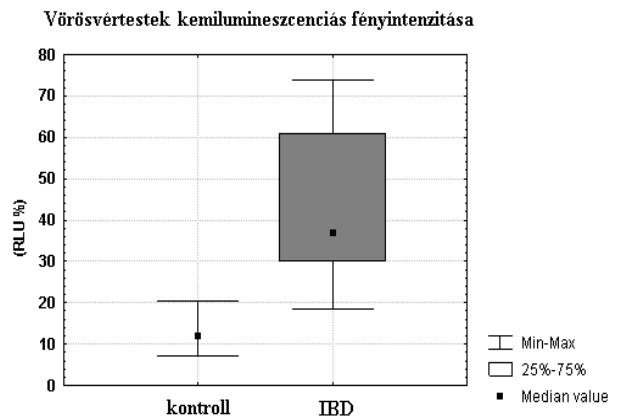
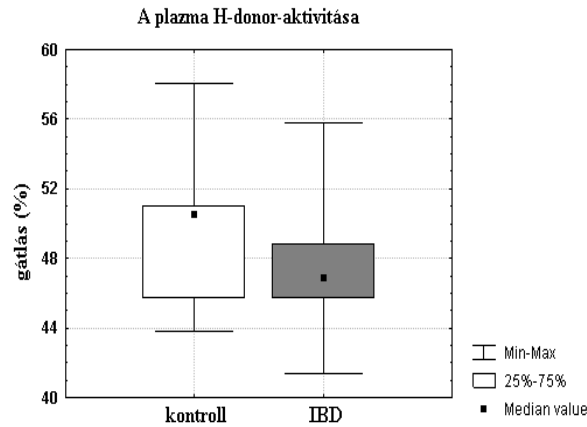
128. ábra



129. ábra



130. ábra



Annak ellenére, hogy a betegek megfelelő terápiában és táplálékkiegészítésben részesültek, ami a betegség remisszióját eredményezte, a vörösvértestek gyökfogó kapacitása mégis elégtelennek bizonyult. (A nagyobb RLU % érték nagyobb szabadgyök-szintet jelent.) Ebből az adatból egy korábbi, súlyosabb állapotra következtethetünk a vörösvértestek lecserélődésének megközelítően 108 napos ciklusát ismerve.

A redoxiparaméterek közötti korrelációs viszonyokat mutatja a 43. táblázat.

43. táblázat

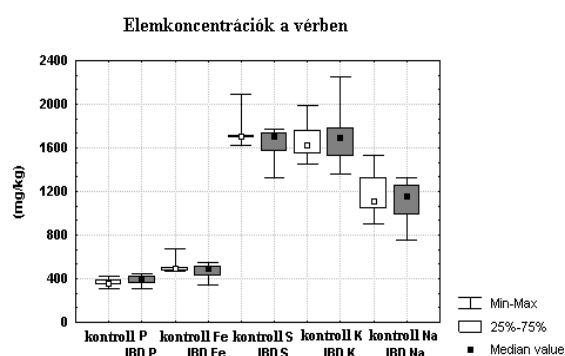
Párhuzamos és ellentétes változások IBD-ben			
pozitív korreláció		negatív korreláció	
a vérben			
UA – HBG	(r = 0,7913; p = 0,004)	eryCL – UA	(r = - 0,7743; p = 0,009)
UA – HCT	(r = 0,8332; p = 0,001)	eryCL – HBG	(r = - 0,8214; p = 0,004)
UA – PHDA	(r = 0,6328; p = 0,020)	eryCL – CRP	(r = - 0,8987; p < 10 ⁻⁴)
UA – PRP	(r = 0,6229; p < 10 ⁻⁴)	eryCL – PHDA	(r = - 0,8281; p = 0,003)
PFSHG – Na	(r = 0,7472; p = 0,013)	eryCL – PRP	(r = - 0,8942; p < 10 ⁻⁴)
PHDA – PRD	(r = 0,8780; p < 10 ⁻⁴)	eryCL – HTC	(r = - 0,8131; p = 0,004)
RBC – HCT	(r = 0,6103; p = 0,046)	PHDA – TP	(r = - 0,5783; p = 0,038)

PHDA - K	($r = 0,7040$; $p = 0,016$)		
(Rövidítések: TP = összfehérje; RBC = vörösvértest; HCT = haematocrit; UA = húgysav; PFSHG = szabad SH-csoport a plazmában; CRP = C-reaktív protein)			

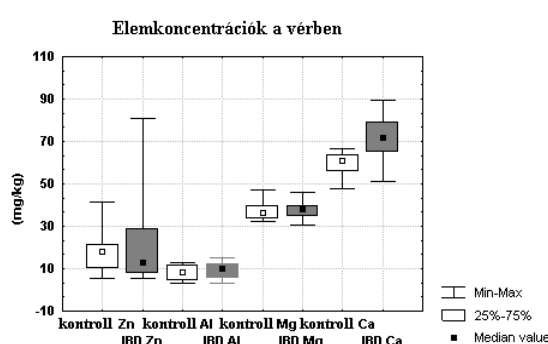
A korrelációk azt mutatják, hogy a vörösvértestek károsodása nagyobb, ha a plazma redukálóképessége és H-donor-aktivitása gyengébb. A húgysavkoncentráció pozitívan befolyásolja az antioxidáns aktivitást, tehát nem meglepő, hogy kisebb plazmakoncentrációja mellett a vörösvértestek jobban károsodnak.

A 131. és 132. ábra a kontroll- és a betegcsoport elemkoncentrációit mutatja. Nem találtunk szignifikáns különbséget a betegek és az egészségesek vér Al-, Ca-, Cu-, Fe-, K-, Mg-, Na-, P-, S- és Zn- koncentrációiban.

131. ábra



132. ábra



A fémionok koncentrációinak alakulását tanulmányozva megemelkedett Zn-koncentrációt találtunk több IBD-ben szenvedő beteg vérében, ami a táplálékkiegészítésnek köszönhető, ugyanakkor a Zn és a Fe koncentrációja szignifikánsan negatív korrelációt mutatott. A Zn- vs Fe-mennyiség negatív korrelációt adott a szérumban ($r = -0,7386$; $p = 0,015$) és a vérben is ($r = -0,7520$; $p = 0,012$), valamint több negatív korrelációt találtunk az elemek és a rutin laboratóriumi paraméterek között is: Zn - MCH ($r = -0,5924$; $p = 0,071$); Zn - MCHC ($r = -0,6916$; $p = 0,027$); Zn - K ($r = -0,7140$; $p = 0,020$); Zn - S ($r = -0,8873$; $p = 0,001$); Zn - Na ($r = -0,6662$; $p = 0,035$); Zn - Cu ($r = -0,8126$; $p = 0,004$). Pozitív korreláció volt a trombociták száma és a Zn koncentrációja között ($r = 0,8516$; $p = 0,002$).

Természetesen a Fe-koncentráció pozitív korrelációban volt az MCV ($r = 0,6753$; $p = 0,032$); MCH ($r = 0,7908$; $p = 0,006$); MCHC ($r = 0,7285$; $p = 0,017$) értékekkel, és a Mg- koncentráció szintén pozitív korrelációt adott az MCV ($r = 0,6841$; $p = 0,029$); MCH ($r = 0,7877$; $p = 0,007$); MCHC ($r = 0,7126$; $p = 0,021$) értékekkel.

Egy férfibeteg esetében súlyos vashiányos anaemia lépett fel annak ellenére, hogy gyógyszerelése és táplálékkiegészítő készítménye nem tért el az ajánlott protokolltól. Vérének Zn-koncentrációja 81,069 $\mu\text{g/ml}$, vaskoncentrációja: 298 $\mu\text{g/ml}$ volt ICP-OES meghatározással.

A rutin laboratóriumi vizsgálatok során a következő értékeket mértük: szérumvas: 4,4 $\mu\text{mol/l}$ (né.: 8,8-27,0 $\mu\text{mol/l}$); MCHC: 298 g/l; (né.: 320-360 g/l); MCH: 25,6 pg (né.: 8-34 pg); haematocrit: 0,372 (né.: 0,42-0,50), haemoglobin: 111 g/l (né.: 140-170 g/l); vaskötőkapacitás: 79,9 (né.: 44 ± 80). A többi érték normális volt.

Egy nőbeteg esetében relatív kis Fe-koncentrációt mértünk, és nem találtunk különbséget a plazma össz-scavenger kapacitás értékben a kontrollokhoz viszonyítva. Amíg a Fe-plazmaszintben 20 % -nál nem volt nagyobb csökkenés, addig nem kaptunk szignifikánsan kisebb vörösvértest össz-scavenger kapacitás értéket.

Kimutatási határ alatt volt a betegek vérében az As, B, Ba, Cd, Co, Cr, Hg, Li, Mn, Mo, Pb és Ti koncentrációja (teljes térfogat = 1 ml) (Blázovics 2004c).

A 44.-46. táblázatokban összegyűjtöttük a különböző elemek egymáshoz viszonyított korrelációit.

44. táblázat

Párhuzamos változások IBD-ben			
pozitív korreláció a vérben			
Al – Cu	($r = 0,9620$; $p = 0,025$)	Mg – Fe	($r = 0,6345$; $p = 0,049$)
Al – Zn	($r = 0,7249$; $p = 0,042$)	Mg – K	($r = 0,7512$; $p = 0,012$)
K – Fe	($r = 0,9383$; $p < 10^{-4}$)	Mg – S	($r = 0,7113$; $p = 0,048$)
K – P	($r = 0,7981$; $p = 0,006$)	S – P	($r = 0,6899$; $p = 0,027$)
K – Cu	($r = 0,7825$; $p = 0,022$)	S – Fe	($r = 0,8087$; $p = 0,005$)
K – S	($r = 0,8108$; $p = 0,015$)	S – Cu	($r = 0,7534$; $p = 0,012$)
Fe – P	($r = 0,8187$; $p = 0,004$)	S – Na	($r = 0,6734$; $p = 0,033$)
Fe – Cu	($r = 0,6423$; $p = 0,045$)	S – P	($r = 0,6899$; $p = 0,027$)

45. táblázat

Párhuzamos változások IBD-ben			
pozitív korreláció a vérben			
P – CHOL	($r = 0,7577$; $p = 0,120$)	S – PLT	($r = 0,6791$; $p = 0,031$)
K – MCV	($r = 0,6600$; $p = 0,038$)	K – MCH	($r = 0,7317$; $p = 0,016$)
Na – PFSHG	($r = 0,7472$; $p = 0,013$)	Mg – MCV	($r = 0,6841$; $p = 0,029$)
Mg – MCH	($r = 0,7877$; $p = 0,007$)	Mg – MCHC	($r = 0,7126$; $p = 0,021$)
(Rövidítések: MCV = mean corpuscular volume; MCH = mean cell haemoglobin; MCHC = mean corpuscular haemoglobin concentration; PFSHG = szabad SH-csoport a plazmában; PLT = trombocita; CHOL = koleszterin)			

46. táblázat

Ellentétes változások IBD-ben	
negatív korreláció a vérben	
Zn – S	($r = -0,8873$; $p = 0,001$)
Al – S	($r = -0,6406$; $p = 0,046$)
Na – UA	($r = -0,6681$; $p = 0,035$)
Na – HCT	($r = -0,6347$; $p = 0,049$)
Na – PLT	($r = -0,8178$; $p = 0,004$)
(Rövidítések: HCT = haematocrit; PLT = trombocita; UA = húgysav)	

Következtetések

A kísérletek eredményéből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a nyomelemkiegészítő-terápia veszélyeket is rejthet magában, mert a szervezet számára fontos nyomelemek egymás felszívódását és hasznosulását jelentősen befolyásolhatják. Fel kell tehát hívni a betegek figyelmét arra, hogy kizárólag az orvos által javasolt készítményeket fogyasszák, és tartsák be a terápiás ajánlásokat (Blázovics 2004c).

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A fiziológias szignálok (hormonok, citokinek, szabad gyökök, antioxidánsok stb.) és a környezeti tényezők (radioaktivitás, kémiai ágensek, szabad gyökök, antioxidánsok, nyomelemek stb.) befolyásolják a génexpressziót. Az oxidatív stressz kulcsfontosságú modulátor, amely extracellulárisan és intracellulárisan is módosíthatja a ligand-receptor kölcsönhatásokat. A szabad gyökök másodlagos hírvivőként hatnak számos jelátviteli úton, részt vesznek a kemotaktikus citokinek és sejtfelszíni adhéziós molekulák aktiválásában stb. (Powis 1997, Estrov 1999). Az oxidatív stressz indukálja a stressz-válasz géneket, ugyanakkor a mérsékelt oxidatív stressz down-regulálja számos gén expresszióját (Morel 1999, Roebuch 1999). A DNS-szintézis, a szelektív génexpresszió, az enzimek aktiválása és a sejtproliferáció szabályozása érintett a redoxi-jelátvitelben. A mérsékelt szintű szabadgyök-termelés módosíthatja a kinázok működését, vagy közvetlenül aktiválhatja a transzkripciós faktorokat, ezáltal befolyásolja a génszabályozást a magban. Feltételezik egy szuperoxid-kötő sejtfelszíni receptor létezését is, amely részt vehetne a kinázok aktiválásában (McCord 2000). A NF- κ B és AP-1 olyan proteinek, melyek működését a reaktív oxigén intermedierek a patológiás folyamatok során szabályozhatják (Schulze-Osthoff 1997). Például a hidrogén-peroxid képes indukálni a NF- κ B aktivációját (Meyer 1993), ugyanakkor csak nagyon gyengén befolyásolja az AP-1 DNS-hez történő kötődését (Lander 1995). Az antioxidáns, vagy scavenger típusú vegyületek, illetve e molekulákat tartalmazó természetes eredetű készítmények befolyásolják, módosítják a sejtciklus szabályozását (MacGregor 1978, Liebler 1990, Sahu 1994, Yang 2000).

A legismertebb vitaminok, mint például az A-, C- és E-vitamin hatásukat génszinten is kifejtik, mert közvetve antioxidáns karakterük révén, illetve közvetlenül hatnak a jelátviteli utakra, a génszabályozásra és a fehérjeszintézisre (Vásárhelyi 1993, Blázovics 1996a, Yang 2000, Lunec 2002, Azzi 2004, 2004a).

Biológiai rendszerekben a szabadgyökös reakciók kimutatására számos direkt és indirekt módszer áll rendelkezésre. A direkt módszerek etikai okok és jelentős költségigényük miatt kevésbé alkalmazhatók az orvostudományban, illetve a klinikumban (Kocsis 2003, 2003a 2004). Az indirekt módszerek is, - amelyek azonosítják, illetve meghatározzák a szabadgyökös reakciók során keletkező vegyületek koncentrációját, a szabad gyökök káros hatásának következtében az enzimek aktivitásában, mennyiségében bekövetkező változásokat, a szubcelluláris partikulumok funkciójának károsodását, vagy a sejtek apoptózisát, nekrozisát - csak az utóbbi években váltak rutinszerűvé az egyes orvoscsoportok számára (Ágoston 2001, Kocsis 2003, 2003a, 2004).

Kutatásaink során arra törekedtünk, hogy a lehetőségeknek megfelelően korszerű, egzakt vizsgálati módszereket adaptáljunk, illetve fejlesszünk ki in vitro és in vivo vizsgálatainkhoz. Kérdéseink megválaszolására spektrofotometriás, luminometriás, HPLC, GC, GC/MS, ESR, IR és ICP-OES technikákat alkalmaztunk (György 1990, 1992, Blázovics 1992, 2000, 2001, 2003, Zsinka 1992, 1995, 1998, Prónai 1993, Lugasi 1998, Szentmihályi 2002, Héthelyi 2001, 2004). A bioaktív molekulák antioxidáns és gyökcsapda tulajdonságának meghatározására direkt és indirekt módszereket használtunk. Spektrofotometriás és luminometriás módszereket fejlesztettünk ki az antioxidáns tulajdonság vizsgálatára in vitro és in vivo. Az ezekkel a metodikákkal kapott eredményeket ESR, impulzus radiolízis és amperometriás technikákkal vetettük össze, (Prónai 1993, György 1992). Rutinvizsgálatok elvégzésére is alkalmas luminometriás módszereket fejlesztettünk ki emberi vonatkozásban is (Blázovics 1999a, Lugasi 2001, Sárváry 2001, Hagymási 2002, Kocsis 2004). Állatkísérleteink során a biokémiai és immunológiai, valamint a kvantitatív analitikai vizsgálatokat morfológiai tanulmányokkal egészítettük ki (Blázovics 1992, 1995a, 2002, 2003c, Fehér 1993). A fény- és elektronmikroszkópos felvételek igazolták a szabad gyökök által okozott szöveti károsodásokat, illetve a természetes eredetű antioxidánsok kedvező élettani hatását. Ph.D. tanítványaimmal és aspiráns munkatársaimmal közösen rövid kísérleti idő alatt, úgynevezett „short term” állatkísérletekben (alimentáris hyperlipidaemia, partialis hepatectomia, ductus choledochus kanülálása, keringését megtartó, passzázból kizárt bélszakaszon végzett vizsgálatok) és több hónapon át tartó emberen végzett vizsgálatokban tanulmányoztuk a redox-homeosztázist (Horváth 2001, Abdel-Rahman 1995, Lugasi 2001, Hagymási 2002, Sípó 2001, Kocsis 2004, Rapavi 2005). Ebben a dolgozatban csak a hyperlipidaemia és partialis hepatectomia modellen végzett kísérleteinket részleteztem.

Kiemelten foglalkoztam a *Sempervivum tectorum* vizes kivonat hatásmechanizmusának vizsgálatával, hogy be tudjam mutatni azt a széles módszertani összeállítást, amelyet kutatásaink során alkalmazunk. A természetes hatóanyagok protektív, preventív és regressziót biztosító hatásának vizsgálatára kidolgozott állatkísérletes modelljeink nemcsak a szabad gyök-antioxidáns egyensúly tanulmányozására voltak alkalmasak, hanem az egyéb jelentős immunológiai, illetve

biokémiai hatások, és az esetleges mellékhatások igazolására is. A humán vizsgálatok során kidolgozott, a redox-homeosztázis meghatározására alkalmas kit (plazma és vörösvértest mintákon) különösen jelentős gasztrointestinális betegségek terápiája alatt és tumoros folyamatok korai felismerésében (Blázovics 1999a, 2004d, Szilvás 2001, Sárváry 2001, Hagymási 2004).

Természetes hatóanyagokkal végzett kutatásainkkal az volt a célunk, hogy azok kedvező membránvédő, immunstimuláns redox-homeosztázist befolyásoló hatásuk mellett feltárjuk esetlegesen kedvezőtlen, vagy éppen toxikus hatásait is a máj, az epe és a bél vonatkozásában, különös tekintettel a készítmények nemkívánatos komponenseire, illetve azok esetleges szennyezettségére (Blázovics 1989, 2003a,b Breinholt 1999, Carver 1983, Hagymási 2001, Laughton 1989, Zheng 1994, Willhite 1982, Czinner 2003).

5.1. In vitro vizsgálatok

Különös fontossággal bírnak azok a drogok, amelyek jelentős antioxidáns tulajdonsággal is rendelkeznek. A "Declaration of Saas Fee" (1992) értelmében az antioxidánsok az egészség megőrzéséhez szükséges aktív komponensek, melyek jól kiegyensúlyozott táplálkozással jutnak szervezetünkbe (Packer 1996).

Az utóbbi évek kutatásai - a gyakran több ezer éves hagyományokra épülve - igazolták, a gyógyteák, gyümölcs- és zöldségkivonatok kedvező immunstimuláns, antioxidáns, daganatellenes hatásait a primer és szekunder prevencióban (Blázovics 2004a,b Lugasi 2001a,b, 2002). E széleskörű hatás előidézésében az újabb kutatások sok antioxidáns molekula génszintű reakcióit igazolják (Lunec 2002, Azzi 2004, 2004a).

Az évek során kerestük azokat a drogokat, kivonatokat, és természetes eredetű gyógyszereket, amelyek a népgyógyászatból ismertté vált máj- és bélbetegségekben alkalmazható készítmények, és antioxidáns hatásuk feltételezhető. E szerekek gyakran cholererticus, cholekineticus, a bél motilitását fokozó hatásuk van. Vizsgálataink azt a célt szolgálták, hogy értékeljük és újraértékeljük a népgyógyászatban alkalmazott növények hatásait.

A polifenolok, és különösen a flavonoidok kis molekulású vegyületek, amelyek széles körben elterjedtek a növényvilágban. A flavonoidok aglikon, glikozid és metilált derivátumok formáiban ismertek (Middleton 1984, Lugasi 2000, 2001, Tarr, 2002). A flavonoidok kémiai struktúrája hasonlít a nukleozidokra, izo-alloxazinra, folsavra, amely bizonyos értelemben behatárolhatja a vegyületek biológiai hatásait (Havsteen, 1983). A flavonoid-struktúrák antioxidáns tulajdonságokat hordoznak (Kéry 2001, 2003). Az antioxidánsok Janus-arcú vegyületek. Például több poli-OH szubsztituált flavonoid toxikus szabad gyököket (szuperoxidiont és hidrogén-peroxidot) generál biológiailag releváns pH-n in vitro autooxidáció során, miközben szemikínononná alakul (Hodnick 1986).

A gyökcsapdákra jellemző szerkezet valószínűsíthetően más, tulajdonságokat is meghatározhat, mint például a fehérjeszintézis befolyásolása a riboszómákon, vagy enzimek aktiválása, gátlása stb. (Polya 2002). Az utóbbi évek kutatásai in vitro igazolták a flavonoidok közvetett hatását a jelátviteli utakra (Packer 1999).

A flavonoidok antioxidáns tulajdonságának tanulmányozásába kutatócsoportunk is korán bekapcsolódott (Fehér 1985, Blázovics 1986, György 1990, 1992, Blázovics 1992). Az antioxidáns tulajdonság a fenolos-OH-csoportok, a molekulában található kettőskötések, valamint az egyéb funkciós csoportok számától és helyétől függ (Bors 1987, 1990). Általában azt lehet mondani, hogy minél inkább hatásos egy gyökfogó, annál inkább toxikus.

Számos tudományos kutatóhelyen vizsgálják a polifenolok és flavonoidok daganatellenes hatását tumorsejt-kultúrákban, illetve gyulladáscsökkentő és antioxidáns tulajdonságaikat különböző kísérletes körülmény között (Kong 1998, Sakagami 2000, Hagymási 2001). Például az epigallokatechin-3-galláttal történő kezelés a tumorsejtekben az NF- κ B gátlásán keresztül a sejtciklus deregulációját és apoptózist okozza. Ezt a hatást egészséges sejtek esetében nem észlelték. Egészséges humán epidermális keratinocitákban csak igen nagy koncentrációban tapasztalták a NF- κ B konstitutív expressziójának és aktiválásának gátlását (Ahmad 2000). A fenolos típusú antioxidánsok képesek befolyásolni a mitogénaktivált protein-kináz (MAPK) szignálmolekulákat is, amelyek az apoptózist kezdeményező gének indukciójához vezetnek (Kong 1998). A MAP-kinázok (JNK és p38 utak) részt vesznek a NF- κ B transzkripció aktivitásában (Schulze-Osthoff 1997, Ramachandiran 2002).

A hidrolizálható tanninok citotoxikus aktivitását igazolták humán oralis squamous sejt carcinomában és nyálmirigy-tumor sejteken, de ezt nem tapasztalták egészséges sejtenyészetekben. Sok makrociklikus ellágtannin-oligomer mutat citotoxikus aktivitást. Ezek a vegyületek a sejtek apoptotikus halálát kezdeményezik. Ismert, hogy e vegyületek nagy koncentrációban maguk is radikális gyökökké válnak, azaz prooxidánsok (Sakagami 2000). A flavonoidok koncentrációtól függően gátolják, illetve fokozzák a TNF- α citotoxicitását L-929 sejteken (Habtemariam 1997).

A kedvező in vitro kísérletek ellenére azonban még mindig keveset tudunk arról, hogy ezek a molekulák milyen módon és mértékben abszorbeálódnak a gastrointestinalis tractusban, és jutnak el a távoli szövetekbe. Különösen a tanninok precipitálják a fehérjét, ezért penetrációjuk kérdéses (Okuda 1995, Lugasi 2000). E kutatások akkor kaptak igazán jelentőséget, amikor az úgynevezett „francia paradoxon” híre bejárta a világot (Renaud 1992).

Saját kísérleteinkben számos természetes eredetű növényi kivonatot, mint például a *Raphanus sativus niger* (Lugasi 1998, Blázovics 2005, Kocsis 2002), *Sempervivum tectorum* (Kéry 1992, Blázovics 1993a,b, 1994, 2000b, 2002), *Cichorium intibus* (Kocsis 2004), *Taraxacum officinale*

(Hagymási 1999, 2000b), *Helichrysum arenarium* (Czinner 1999, 2000, 2001), *Peroselinum crispum* (Fejes 2000a,b), *Anthriscus cerefolium* (Fejes 2000a,b) liofilizált extraktumokat, *Solidago canadensis* (Apáti 2004) és *Ginkgo biloba* alkoholos és vizes extraktumokat (Stefanovits-Bányai 2002, 2005), valamint a silibinin (Blázovics 1988b, 1989, Fehér 1996, Horváth 2001), silymarin (Hagymási 2000, 2002) hatóanyagokat vizsgáltunk meg. A készítmények közül az E-vitamint (Horváth 1993a, Fehér 1996a, Blázovics 2002) Hegrimarint (Hagymási 2002), Raphacolt (Lugasi 1998, 2001a,b, Kocsis 2002, Sípos 2002, Blázovics 2005), Rowacholt (Sípos 2001) és Detralexet (Rapavi 2002) teszteltük. Elvégeztük a Beiqishen tea részleges fitokémiai és elemanalízisét (Héthelyi 2001, Blázovics 2003a,b), összehasonlítottuk a Holub, Rózsa és Mate teákkal (Szentmihályi 2003, 2004a), valamint vizsgáltuk a Körömvirág, Májbédő, Hibiszkusz, Tisztító, Salaktalanító Gyomorteá és Zöldtea készítményeket (Blázovics 2003, Rapavi 2003). E vizsgálatok igazolták azt a feltételezésünket, hogy a gyógyhatású készítmények gyakran úgynevezett „hatóanyagbombák”. A termékek reklámja sok esetben sablonos, és nem ismerteti az esetlegesen jelentkező mellékhatásokat. Az utóbbi években divattá vált az egzotikus növényekből készült italok, ételek fogyasztása is. A jórészt ismeretlen, vagy hallomásból ismert drogok veszélyforrást jelenthetnek, mert hatóanyagaik súlyos máj- és vesekárosodást, szélsőséges esetben halált okozhatnak (Witting 1980, Haraszi 1985, Tsuchiya 1992, Gartner 1993, Herbert 1993, Jadoul 1993, Venherweghem 1993, Adams 1993, Geiger 1994, Halliwell 2000, Hagymási 2004).

A magyar lakosság számára kevésbé ismert, de világviszonylatban jelentős tea, a Mate, Rózsa, Holub és Beiqishen tea elemanalízise jelentős nehézfém-szennyezettséget igazolt (Blázovics 2002, 2003a,b, Szentmihályi 2003, 2004a). A drogok fémionösszetételének ismerete nagyon fontos, mert a napi ásványianyag-szükséglet a teák fogyasztásával fedezhető, vagy kiegészíthető (RDA 1989, Máday 2000). Az európai teaivási szokások azonban, ellentétben a Távol-Keleten kialakult szertartásos tea fogyasztással, nem veszik figyelembe, hogy a drogok gyakorta nehézfém tartalmú talajjal szennyezettek. Távol-Keleten a teaivási ceremónia alatt általában előntik az első forrázatot, ezzel megszabadulnak a szennyeződésektől. A drogokból történő hatóanyag kioldódás idejét is pontosan betartják, míg nálunk ezzel általában nem törődnek. A keleti gyógyítás-filozófia szívesen alkalmaz ellentétes hatásokat kiváltó természetes eredetű alapanyagokat egy készítményen belül is (Rapavi 2000, 2000a). A kezelések során nagyobb figyelmet fordítanak a betegek eltérő fiziológiai tulajdonságaira.

A távol-keleti készítmények hazai alkalmazása a nyelvi nehézségek és a számos félrefordítás miatt veszélyeket rejt (Héthelyi 2001, Blázovics 2003b).

5.2. In vivo állatkísérletek

Májbetegségek terápiája kapcsán korán felfigyeltünk azokra a változásokra, amelyek háttérben szabadgyökös reakciók hatásait sejtettük. Mivel a szabadgyökös folyamatok egészséges szervezetben nehezen tanulmányozhatók, szükségünk volt megbízható és adekvát kísérletes modellek megtervezésére. A zsírmáj- és extrahepaticus cholestasis- modellek mellett a partialis hepatecomia-modellt is bevezettük kutatási repertoárunkba (Blázovics 1992, Hagymási 2001a, Horváth 2001c). Állatkísérletekben igazoltuk a redox-homeosztázis tényét, a szabad gyök – antioxidáns egyensúly fontosságát (Blázovics 2004b). E vizsgálataink során tanulmányoztuk az epében zajló szabadgyökös változásokat a kőképződéssel összefüggésben és a kóros összetételű epe bélnyálkahártyát irritáló hatását (Blázovics 1994, 1995, 1996, 1997a,b,c, 2002, Sípos 1997, 2001, 2001b, 2002, 2003).

A természetes eredetű antioxidánsok, nevezetesen a vitaminok, polifenolos vegyületek, különösen a flavonoidok elsődlegesen táplálkozással jutnak szervezetünkbe. Az egészséges, növényi anyagokban bőséges táplálék biztosítja a kellő mennyiségű antioxidáns molekulát a szervezet számára. A hiányállapotok jellegzetes megnyilvánulása például a scorbut, vagy a farkasvakság. Az érfalak normális funkcióját a C-vitamin és a flavonoidok együttesen biztosítják. A polifenolos vegyületek túladagolása, különösen a tanninoké azonban a béltraktusban felgyorsíthatja az apoptózist, sőt nekrotikus folyamatokat indíthat el, mert nagy koncentrációban kicsapja a fehérjéket.

Különböző adatok szerint a flavonoidok napi bevitele a néhány mg-tól az 1 g-ig terjedhet (Kühnau 1976, Hertog 1993, Arai 2000). A teljes flavonoidbevitelből azonban csak elenyésző mennyiség jut a keringésbe (Lugasi 2000). Ez a tény jelentősen megkérdőjelezi sok in vitro tanulmány eredményét.

Ezek a vegyületek koncentrációtól függően antioxidáns és prooxidáns tulajdonságúak lehetnek. A szervezetbe azonban nem minden polifenolos molekula jut be eredeti alakjában a felszívódási nehézségek miatt, illetve a bélbaktériumok hatásának következtében (Cook 1996, Conquer 1998, Shimo 1999). A változatlan szerkezetű flavonoidoknak kevesebb, mint 1 %-a éri el a keringést. A vastagbélben a bakteriális β -glükózidáz hatására szabaddá váló aglikonok a felszívódást követően konjugálódnak, metilálódnak vagy glükuronidálódnak. A szervezetben a mikroszomális kevertfunkciójú oxidázok képesek e molekulákat is átalakítani, és előfordulhat, hogy a termékek toxikussá válnak, illetve jelentős szabadgyök-termelés indul be (Amer 1966, Hollman 1995, 1996, 1997, Lugasi 2000, Blázovics 2002a).

A polifenolos vegyületek befolyásolhatják a fémionok felszívódását, mert komplexet képezhetnek velük, bár a már említett precipitin reakciók közvetetten is befolyásolják a fémionok átjutását a membránokon (Lakatos 2004). A polifenolok azonban képesek a nehézfémionokat eltávolítani a szervezetből (Blázovics 2003a). Újabb vizsgálataink

megegerősítették, hogy a *Sempervivum tectorum* kedvező élettani hatásához a májban felhalmozódott toxikus fémionok eliminálása is hozzátartozik (Blázovics 2002, Szentmihályi 2000b). Hyperlipidaemiában az elem-metabolizmusok megváltoznak. A toxikus elemek többsége akkumulálódik, jelezve a máj detoxikáló-képességének csökkenését. Ezért azok a természetes hatóanyagok, melyek alkalmasak e fémionok kiürítésének gyorsítására, a primer prevenció eszközei lehetnek (Blázovics 2002, Szentmihályi 2004). A fémionanyagcserével kapcsolatos vizsgálatainkért a Kyotóban rendezett SFRR Konferencián a legjobb első 5 poszterért járó díjat kaptuk (Szentmihályi 2000c).

A nehézfémionok akkumulációja szignifikáns mértékben befolyásolja a sejtek életműködését. Különösen veszélyes a Ni, Hg és az Pb. Ezek az elemek hatással vannak a scavenger molekulák antioxidáns, illetve prooxidáns formáira is (Blázovics 2002). A fémek közvetlenül, vagy közvetett módon képesek befolyásolni a jelátviteli utakat, a génátíródást, fehérjeszintézist, fehérjék aktiválódását, gátlását stb. A fémionok befolyásolják a gyulladásos folyamatokat (Kernohan 1996). A DNS-javító mechanizmusok különösen érzékenyek a Ni, Cr ionok mellett az As-re is (Hartwig 1998). Bár az egzakt mechanizmus nem ismert, a toxikus fémionok versengenek a Mg-ionokkal, ezáltal sok biokémiai folyamatot gátolnak. A Ni(II) és a Mg(II) közötti kompetíció károsan befolyásolja a DNS - protein interakciókat, gátolja az átíródás folyamatát, mely részben javítható Mg(II) adásával (Kasprzak 1987, Hartwig 1994). A Ni(II)-, Co(II)- és As(II)-ionok kiszorítják a Zn-et a DNS-javítóenzimek Zn-ujjából (Hartwig 1998). A Ni, Cr és az As bizonyítottan, míg a Si és Ti feltételezhetően carcinogének emberben (Hayat 1996, Hadfield 1998). A Ni és a Fe például együttesen képesek renális sarcomát indukálni (Higinbotham 1992). A Mg és Zn együttadása viszont mérsékli a Ni akut toxicitását. A Ca-ionok többnyire nem befolyásolják a tumorogenezist, és nem befolyásolják a toxikus elemek felvételét sem (Kasprzak 1987). A Fe, Cu és Cr oxidációs számot vált a szervezetben, a Ni viszont nem (Stohs 1995). A lipidperoxidációs folyamatok során a fémionok kitüntetett szerepet játszanak (Blázovics 2002, 2003c, Sípos 2003). Az oxidatív stressz következtében azonban aktiválódik a Zn-függő metallotionein, továbbá a toxikus fémionok indukálják a metallotioneinekért felelős gének expresszióját, aminek az lesz a következménye, hogy ezek a proteinek fokozott mértékben megkötik a fémeket, azaz antioxidáns funkciót fejtenek ki. Ismert az is, hogy a Zn-metallotionein befolyásolja a nyomelemek eloszlását a hepatocitákon belül (Liu 1991). A metallotionein képes a Fe ionokat is megfogni, ezáltal csökkenti a lipidperoxidációt (Powis 1997).

A sokkomponensű természetes eredetű készítmények terápiás alkalmazása, vagy élvezeti cikk formájában történő fogyasztása több problémát is felvet. Ezek közül az alábbiak a leglényegesebbek. A különböző drogok pontos hatóanyagösszetétele sok esetben nem ismert. Ennek több oka van. A legfontosabb, hogy még ma sem ismerjük számos molekula szerkezetét, és

nem rendelkezünk megfelelő ismeretekkel e komponensek élettani hatásáról. A drogok aktív molekuláinak koncentrációja nem mindig azonos. Ez nemcsak a növények életfolyamatainak állandó változása miatt, hanem a termőterületek éghajlatának és talajadottságainak változása miatt is bekövetkezhet. Az egyes fajták között szignifikáns eltérések is lehetnek az aktív molekulák szintézisében. További gond, hogy a különböző növényvédőszeresek visszaszoríthatják a növények természetes védekezésében fontos szerepet játszó polifenolos vegyületek szintézisét is. Előfordulhat, hogy a gondatlan begyűjtés, tárolás, feldolgozás során károsodnak a hatóanyagok. Azt is figyelembe kell venni, hogy a növények különböző fémionokat képesek akkumulálni, de az sem kizárt, hogy talajszennyezettség miatt kerül be toxikus elem a készítményekbe (Tölgyesi 1966, Szentmihályi 1999, 2003, 2004, 2004a, Stefanovits 2002a,b, 2005). Sajnálatos az is, hogy a frissítő hatást gyakran a koffeintartalom növelésével biztosítják, ezért indokolatlanul sok koffeint tartalmazhatnak az egyes készítmények (Blázovics 2003, Szentmihályi 2003, Rapavi 2003).

A növényi eredetű hatóanyagok és fémionok szöveti szabad gyök - antioxidáns státuszra kifejtett hatásának tesztelésére vizsgálati repertoárt fejlesztettünk ki. A kutatások során számos drog, liofilizátum, tea és gyógyszer vizsgálatára került sor (Blázovics 1988b, 1993, 1993a, 1994a,b, 1995a,b, 1996b, 1997, 1999, 2000, 2002, 2003, 2003a, 2004b, Horváth 2001, 2001a,b,c, Czinner 2003, Lugasi 2001, 2002, Hagymási 2001a, 2002, Kocsis 2002, 2004, Rapavi 2003). Silibininrel végzett vizsgálatainkat a „Handbook of antioxidants” (Marcel Dekker Inc. New York, USA) említi (Cadenas 1996). A *Sempervivum tectorum* növényből készült liofilizált extraktummal végzett kutatásainkat (Blázovics 1994a) a német „Hagers Handbuch, Drogen L-Z (Springer), csaknem teljes terjedelmében ismerteti (Blaschek 1998) Eredményeinkre felfigyelve felkérést kaptunk a SCI TECH Publishing LLC-től (Texas, USA) könyvfejezetek megírására (Blázovics 2002, Lugasi 2002).

5.3. Humán tanulmányok

A bél- és májbetegségek gyakori kísérője az epekőképződés. Cholecystectomián átesett betegek hólyagepéjének lipidperoxidációs paraméterei azt mutatták, hogy az epe bilirubintartalma miatt várható antioxidáns védelem megkérdőjelezhető, sőt feltételeztük, hogy a bilirubinból képződő szabad gyökök hozzájárulnak a kőképződéshez (Blázovics 1997c, 1998, Sárosi 1997, 2001, 2001a, Szentmihályi 2002). Kutatási eredményeiket FALK II. díjjal ismerték el (Falk Symposium, Pozsony, 1996) (Blázovics 1997b).

Az antioxidáns vitaminokat és polifenolos vegyületeket tartalmazó Raphacol epegranulátum „long term” vizsgálatával az epekő megelőzésén kívül a készítmény gyulladáscsökkentő, antioxidáns és a bél motilitását befolyásoló, valamint enyhe baktericid és fungicid hatását is kihasználva IBD-ben kedvező szubjektív megítélés mellett enyhe szérumepe-savszint emelkedést

figyeltünk meg, ami fokozott ellenőrzést igényel (Blázovics 2004f, Kovács 2001). A plazma és a vörösvértestek redoxi-mutatói ellentétesen változtak a fél éves kezelési periódus alatt, amit megerősít a Raphacollal nem kezelt IBD-s betegeken végzett vizsgálatok eredménye is.

Korábbi kutatásaink eredményessége alapján az volt a célunk, hogy Berthold Lumat készülékre redox-homeosztázist vizsgáló nem invazív módszereket fejlesszünk ki (Horváth 1992, 1992a, 1994). A kemiluminometriára épült plazma és vörösvértest össz-scavenger kapacitás vizsgálat számos költséges meghatározást vált ki. Ezek a munkák teremtették meg az alapját a Diagnosticum Rt TSC 48561/2004 számú luminometriás kit kidolgozásának (1. Melléklet). Összehasonlítva a plazma luminometriás módszerrel kapott eredményeket a RANDOX cég által forgalmazott TAS kittel kapott értékekkel, megállapítható volt, hogy a luminometriás módszer szignifikánsan érzékenyebb a spektrofotometriás módszernél (Kocsis 2004a). A vörösvértestek össz-scavenger kapacitásának meghatározására kifejlesztett módszer alkalmazható volt gyulladásos bélbetegségek, rosszindulatú daganatos folyamatok, alkoholfüggő betegek, máj- és vesetranszplantáltak vizsgálatában (Blázovics 1999a, 2000, Hagymási 2001, 2002, 2004, Lugasi 2001, Kocsis 2003, 2004, Sárváry 2001, Szilvás 1999, 2001a). A transzplantáció szabadgyökös vonatkozásaival kapcsolatos kutatásainkat 2002-ben „Bruno Watschinger Award for the Best Poster” (Sárváry 2002), a Gilbert-kór és az alkoholos májbetegség tanulmányozása terén elért eredményeinket (Hagymási 2004b) az „Alapítvány a Magyar Gyógyszerkutatásért” kuratóriuma különdíjjal jutalmazta.

„Az egészséges táplálkozás tudományos alapjai” című ismeretterjesztő könyvünk (Lugasi-Blázovics 2004) a Magyar Táplálkozástudományi Társaság Tudományos díjában részesült.

A vörösvértest antioxidáns státuszának luminometriás mérése eredeti gondolat (Blázovics 1999a). Megközelítően 1000 ember vizsgálata alapján meghatároztuk a TSC plazma és vörösvértest normálértékeket és a máj-, illetve bélbetegségekben szenvedőkben a különböző stádiumokra jellemző értékeket. A kutatásokba bevont egyének esetében rutin laboratóriumi és UH-vizsgálat is készült. Meghatároztuk az IL-1 β , és IL-6 szinteket, és a tumoros betegeknél tumormarkervizsgálatokat is végeztünk. Minden esetben meghatároztuk a plazma H-donor-aktivitását, redukálóképességét és a szabad SH-csoport koncentrációját is. A H-donor-aktivitás (Blois 1958, Hatano 1988) és redukálóképesség (Oyaizu 1986) vizsgáló módszereket Oyaizu és Hatano munkái alapján kis módosításokkal adaptáltuk emberi betegségek vizsgálatára (Blázovics 1999). Kutatásaink alapján megállapítottuk, hogy a középkorú magyar lakosság redox-homeosztázisa nem kielégítő. A kontrollként jelentkező önkéntesek között több rákos beteget is találtunk. Ezekben az esetekben a betegek vörösvértestjeiben más betegségekben nem tapasztalható, rendkívül magas szabadgyök-szinteket és alacsony antioxidáns aktivitást találtunk. Súlyos alkoholos zsírmájban a nemek között szignifikáns eltérést tapasztaltunk a vörösvértest össz-

scavenger kapacitásban. A nők antioxidáns kapacitása gyengébb volt a férfiakénál. Az alkoholos zsírmáj és a nem alkoholos zsírmáj betegségek között kapott különbségek diagnosztikus értékűek voltak. A vörösvértest össz-scavenger kapacitás növekedése jól követte a szükséges terápia hatásosságát bélbetegségekben és tumoros folyamatokban. Itt, a nemek között nem volt szignifikáns eltérés.

Ezek a redoxiállapotot felmérő módszerek lehetővé teszik nagy betegcsoportok egészségi állapotának felmérését és a betegségmegelőző programok menedzselését. Költséghatékonyan tanulmányozhatóvá válik az antioxidáns kezelések rövid és hosszú távú ellenőrzése, és az adaptációs folyamatok megértése.

6. MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS GYAKORLATI HASZNOSÍTÁS

1. Meghatároztuk in vitro és in vivo számos gyógyhatású készítmény antioxidáns, illetve scavenger tulajdonságát, amelyek kedvezőek a betegségek megelőzésében, és fontos szerepet játszanak a népesség egészségmegőrzésében a nyugati- és fejlődő országokban egyaránt.
2. In vivo „short term” állatkísérletekben igazoltuk a toxikus mértékben felszaporodó szabad gyökökkel szembeni antioxidáns terápia létjogosultságát.
3. Igazoltuk, hogy a silibininrel és a *Sempervivum tectorum*-kivonat antioxidánsaival történő kezelés közvetlen (szabadgyök-scavenger) és közvetett módon (lipidszintcsökkentő) befolyásolja az immunreaktivitást. Hatásuk kedvező a redox-homeosztázis helyreállításában kísérletes zsírmájban.
4. Állatkísérletekben bizonyítottuk, hogy a nagy dózisban alkalmazott természetes hatóanyagokkal történő kezelés ártalmatlan. Ennek oka a redox-homeosztázisba történő durva beavatkozás.
5. Igazoltuk, hogy a kísérletes hypelipidaemia során kialakuló zsírmájban felerősödnek a szabadgyökös folyamatok, és a májban akkumulálódó toxikus fémionok fokozzák a máj lipidperoxidációs folyamatait.
6. Az epével ürülő toxikus fémionok hozzájárulnak a vastagbél mucosa nekrozisához kísérletes zsírmájban.
7. Toxikus fémvegyületekkel (Hg, Cd, Pb) végzett kísérleteink felhívják a figyelmet arra, hogy a táplálékláncan keresztül toxikus fémionok kerülhetnek szervezetünkbe, melyek súlyos májkárosodást is okozhatnak. A nehézfémionok jelentősen fokozzák a máj és az epe lipidperoxidációs reakcióit. A lipiperoxidáció végtermékei daganatkeltő vegyületek.
8. Állatkísérletben, a zsírdús táplálás következtében a bél nyálkahártya károsodása a coecum, colon és rectum bélszakaszokban kifejezettebb, mint a duodenumban, jejunumban és ileumban. Az antioxidáns kezelés szignifikánsan javítja a bélhámsejtek redox-homeosztázisát az utolsó három vizsgált bélszakaszban.

9. Bizonyítottuk a szabad gyökök szerepét az epekőképződésben. Igazoltuk, hogy zsírmájban a májból szekretálódó módosult összetételű epe prooxidáns vegyületeket, többszörösen telítetlen zsírsavakat, diénkonjugátumokat, tiobarbitursav-reaktív-anyagokat és szabad bilirubint szállít az epehólyagba, illetve a bélbe. Bizonyítottuk a bilirubin prooxidáns tulajdonságát az epében.
10. Kifejlesztettünk olyan módszereket, amelyek az emberi szervezet redox-homeosztázisának jellemzésére alkalmasak, és viszonylag egyszerű kivitelezhetőségükből eredően könnyen bevezethetők rutin laboratóriumi alkalmazásra. Ez a lehetőség új utakat nyithat az általános egészségi állapotot felmérő, betegségmegelőző programok megtervezésére és megvalósítására.
11. „Long term” emberen végzett tanulmányban időfüggően eltérő redox-homeosztázis értékeket kaptunk a plazma és a vörösvértest vizsgálatokor antioxidáns kezelés alatt. A szervezet adaptációval válaszolt az antioxidáns kezelésre.
12. Kísérletet tettünk az egészséges felnőttek vörösvértest és plazma össz-scavenger kapacitás normálértékének meghatározására. Megállapítottuk, hogy a betegségek súlyosságának függvényében csökken az össz-scavenger kapacitás. A plazmaértékek mindig az adott időpontnak megfelelő értéket tükrözik, míg a vörösvértestek egy hosszabb időintervallumra vonatkozó értéket mutatnak.
13. Alkoholos zsírmájban a nők vörösvértest össz-scavenger kapacitása rosszabb, mint a férfiaké. A nemek között szignifikáns eltérés tapasztalható.
14. A vörösvértest össz-scavenger kapacitás növekedése jelzi a megfelelő terápia hatásosságát colitis ulcerosában. Crohn-betegek esetében azonban nem tapasztaltunk kedvező változást még inaktív állapotban sem. A nemek között nem volt szignifikáns eltérés.
15. Megállapítottuk, hogy a vörösvértestekben stimulált kemilumineszcenciás fényintenzitás extrém nagy értéke a gastrointestinum tumoros folyamatainak korai jelzője. A vizsgált szérum- és a redox-homeosztázist tükröző paraméterek közötti korreláció a tumoros betegek esetében gyenge, ami arra enged következtetni, hogy a tumor növekedése, szóródása rendkívüli mértékben károsítja az antioxidáns védelem elemeit. A nemek között nem találtunk szignifikáns eltérést.
16. Megállapítottuk, hogy a tumoros betegek halálközeli állapotában (2-3 hónappal a halál beállta előtt) a vörösvértestek rendkívül erős gyökfogó képessége nem az antioxidáns enzimek és vitaminok hatásának következménye. E jelenség vizsgálata jelenleg is folyik.
- 17.** Raphachol epegranulátummal történő „long term” kiegészítő terápia IBD-s betegekben a kedvező szubjektív megítélés mellett, a féléves periódus végére kismértékben megemelte a szérumepesav-koncentrációt, amely nem kívánatos. A várttal ellentétben csökkentette a plazma redoxi-paramétereinek értékeit. Egyéb eltérést nem tapasztaltunk a szérum vizsgálatokor. A Raphachol epegranulátum nem volt befolyással a betegségek fellángolására és átmeneti javulására sem IBD-ben. A Raphachol epegranulátum mérsékelten csökkentette a vörösvértestek HbA_{1c} koncentrációját, és szignifikánsan javította a vörösvértestek antioxidáns kapacitását, ami kedvező.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Adams J.: Structure activity and dose-response relationships in the neural and behavioral teratogenesis of retinoids, *Neurotoxicol. Teratol.*, 1993, 15, 193-202.
2. Abdel Rahman M.: Free radical reactions in bile secretion and gallstone disease, Ph.D. Thesis, MTA, 1996.
3. Abdel Rahman M., Blázovics A., Ágoston M., Asztalos I., Prechl J., Vallent K., Fehér J.: A chemiluminescent study for detection of free radicals in gallbladder bile in gallstone diseases, *Ces. a Slov Gastroent.*, 1995, 49, 7-13.
4. Accaoui M.J., Enou M., Mergny M., Masson C., Dominici S., Wellman M., Visvikis A.: Gamma-glutamyltranspeptidase-dependent glutathione catabolism results in activation of NF- κ B, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, 276, 1062-1067.
5. Admirand W.H., Small D.M.: The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man, *J. Clin. Invest.* 1968, 47, 1043-1052.
6. Ágoston M., Cabello R.G., Blázovics, Fehér J., Vereckei A.: The effect of amiodarone and/or antioxidant treatment on splenocyte blast transformation, *Clinica Chimica Acta.*, 2001, 303, 87-94.
7. Ágoston M., Örsi F., Fehér E., Hagymási K., Orosz Zs., Blázovics A. Fehér J., Vereckei A.: Sylmarin and vitamin E reduce amiodarone-induced lysosomal phospholipidosis in rats. *Toxicology*, 2003, 190, 231-241.
8. Ahmad, N., Gupta, S., Mukhtar, H.: Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor- κ B in cancer cells versus normal cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, 376, 338- 346.
9. Ainley C.C., Cason J., Carlsson L.K., Slavin B.M., Thompson R.P. Zinc status in inflammatory bowel disease, *Clin. Sci.*, 1988, 75 277-283.
10. Alexander L.R., Justice J.B.: Fatty acid composition of human erythrocyte membranes by capillary gas chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr.*, 1985, 342, 1-12.
11. Almallah Y.Z., Ewen S.W., El-Tahir A., Mowat N.A., Brunt P.W., Sinclair T.S., Heys S.D, Eremin O.: Distal proctocolitis and n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs): the mucosal effect in situ, *J. Clin. Immunol.*, 2000a, 20, 68-76.
12. Almallah Y.Z., El-Tahir A., Heys S.D., Richardson S., Eremin O.: Distal procto-colitis and n-3 polyunsaturated fatty acids: the mechanism(s) and natural cytotoxicity inhibition, *Eur. J. Clin. Invest.*, 2000b, 30, 58-65.

13. Ameer, B. Weitraub R.A., Johnson JV., Yost R.A., Rouseff R.L.: Flavone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 1966, 60, 34-40.
14. Anderson W.R., Zieve L., Lindblad S., Ultrastructural study of hepatic regeneration following one-lobe, two lobe and subtotal hepatectomy in the rat, *Exp. Pathol.*, 1990, 3, 61-72.
15. Andrási T.B., Kékesi V., Blázovics A., Dobi I., Szabó, Juhász-Nagy A.: ETA receptor blockade protects the small intestine against ischaemia/reperfusion injury in dogs via an enhancement of antioxidant defence, *Clinical Science*, 2002, 103, 40, 595-635.
16. Andus T., Bauer J., Gerok W.: Effect of cytokines on the liver, *Hepatology*, 1991, 13, 364-375.
17. AOAC Official Methods of Analysis 28054 B. 14th ed.: Arlington, USA, 1984.
18. Apáti P., Balázs A., Blázovics A., Stevenson G., Houghton P.J., Kéry Á.: In vitro módszerek alkalmazása *Solidago canadensis* L. lipidperoxidáció gátló hatásának vizsgálatában, A szabadgyök-kutatás aktuális kérdései, MSZKT Munkaértekezlet, Budapest, 2004.
19. Arai, Y. Watanabe S., Kimira M., Shimoi K., Mochizuki R., Kinae N.: Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration, *J. Nutrition*, 2000, 130, 9, 2243-2250.
20. Argawal, D.P.: Molecular genetic aspects of alcohol metabolism and alcoholism, *Pharmacopsychiatry*, 1997, 30, 79-84.
21. Attili A.F., Carilli N., Roda E., Barbara B., Capocaccia L., Menotti A., Okolicsányi L., Ricci G.: Epidemiology of gallstone disease in Italy: prevalence data of the multicenter Italian study on cholelithiasis, (M.I.C.O.L.) *Am. J. Epidemiol.*, 1995, 141, 158-165.
22. Azzi A.: The role of alpha-tocopherol in preventing disease, *Eur. J. Nutrition*, 2004a, 43, Suppl. 1, 118-125.
23. Azzi A., Gysin R., Kempné P., Munteanu A., Villacorta L., Visarius T., Zingg J.M.: Regulation of gene expression by alpha tocopherol, *Biol. Chem.*, 2004 385, 585-591.
24. Baba, S., Furuta, T., Horie, M., Nakagawa, H.: Studies on drug metabolism by use of isotopes XXVI: determination of urinary metabolites of rutin in humans, *J. Pharmaceut. Sci.*, 1981, 70, 780-782.
25. Bacci M., Linary R., Agati G., Fusi F.: UV excitable fluorescence of lumirubin, *J. Photochem. Photobiol.*, 1989, 3, 419-427.
26. Bach M.K., Brashler J.R., Hammarstrom S., Samuelson B.: Identification of a component of rat mononuclear cell SRS as leukotriene D, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1980, 93, 1121-1126.
27. Bach M.K., Brashler J.R., Hammarstrom S., Samuelson B.: Identification of leukotriene c-1 as a major component of slow-reacting substance from rat mononuclear cells, *J. Immunol.*, 1980a, 125, 115-117.
28. Balsinde J., Balboa M.A., Insel P.A., Dennis E.A.: Regulation and inhibition of phospholipase A2, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1999, 39, 175-189.
29. Baranov V., Hammarstrom S.: Carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1), apically expressed on human colonic M cells, are potential receptors for microbial adhesion, *Histochem Cell Biol.*, 2004 Jan 31 [Epub]
30. Barrios-Rodiles M., Tiraloche G., Chadee K.: Lipopolysaccharide modulates cyclooxygenase-2 transcriptionally and posttranscriptionally in human macrophages independently from endogenous IL-1 beta and TNF-alpha, *J. Immunol.*, 1999, 15, 163, 963-969.
31. Bartoli G.M., Palozza P., Marra G., Armelano F., Franceschelli P., Luberto C., Sgarlata E., Piccioni E., Anti M.: n-3 PUFA and alpha-tocopherol control of tumor cell proliferation, *Mol. Aspects Med.*, 1993, 14, 247-252.

32. Barua A.B., Furr H.C., Janick-Buckner D., Olson J.A.: Simultaneous analysis of individual carotenoids, retinol, retinyl esters, and tocopherols in serum by isocratic non-aqueous reverse phase HPLC, *Food Chem.*, 1993, 46, 419-424.
33. Baumert T., Huber M., Mayer D., Kepper D.: Ethanol-induced inhibition of leucotriene degradation by omega-oxidation, *Eur. J. Biochem.*, 1989, 182, 223-229.
34. Bayes Garsia R., Maldonado Sorano J., Molina Font J.A.: Interrelation of bilirubin and free fatty acids in newborn infants with pathologic conditions, *An. Exp. Pediatr.*, 1989, 30, 27-31.
35. Beers R.F., Sizer I.W.: Spectrophotometry for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *J. Biol. Chem.*, 1952, 195, 133-140.
36. Beilby J., Olynyk J., Ching S., Prins A., Swanson N., Reed W., Harley H., Garcia-Webb P.: Transferrin index: an alternative method for calculating the iron saturation of transferrin, *Clin. Chem.*, 1992, 38: 2078-81.
37. Belluzzi A., Boschi S., Brignola C., Munarini A., Cariani G., Miglio F.: Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, 71, 1, (Suppl), 339S-342S.
38. Belluzzi A., Brignola C., Campieri M., Pera A., Boschi S., Miglioli M.: Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease, *N. Engl. J. Med.*, 1996, 13, 334, 1557-1560.
39. Bendich A., D'Apolito P., Gabriel E., Machlin L.J.: Interaction of dietary vitamin C and vitamin E on guinea pig immune responses to mitogens, *J. Nutr.*, 1984, 114, 1588-1593.
40. Bendich A.: Antioxidant micronutrients and immune responses, *Ann. New York Acad. Sci.* 1990, 587, 168-180.
41. Bendich A.: Antioxidant micronutrients and immune responses, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1990, 587, 168-180.
42. Bendich A, D'Apolito P, Gabriel E, Machlin L.J.: Interaction of dietary vitamin C and vitamin E on guinea pig immune responses to mitogens, *J. Nutr.*, 1984, 114, 1588-1593.
43. Bergman R.N., Ader M.: Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, *Trends Endocr. Metab.*, 2000, 11, 351-356.
44. Besznyák I., Sándor J.: Surgery in Hungary, *Arch. Surg.* 2000, 135, 730-734.
45. Bhaskar L, Ramakrishna B.S., Balasubramanian K.A.: Colonic mucosal antioxidant enzymes and lipid peroxide levels in normal subjects and patients with ulcerative colitis, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1995, 10, 140-143.
46. Bhattacharya M., Peri K., Ribeiro da Silva A., Almazan G., Shichi H., Hou X., Varma D.R., Chemtob S.: Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 15719-15724.
47. Biesel W.R.: Nutrition and immune function, *Overwiev. J. Nutr.*, 1996, 126, S2611-S2615.
48. Bíró Gy. Linder K.: Tápanyagtáblázat, *Medicina Kiadó, Budapest*, 1-285. 1999.
49. Blaschek W., Hansel R., Keller K., Reichlig J., Rimpler H., Schneider G.: (Hrsg) *Hagers Handbuch, Drogen L-Z*, Springer, 1998, 535-539
50. Blázovics A.: Az alkoholos májkárosodás biokémiája, *Folia Hepatologica*, 1999, 4, Suppl. 1, 9-18.
51. Blázovics A.: Oxidative stressz és májbetegség, *Orvosi Hetilap*, 2004, 145, 38, 1937-1942.
52. Blázovics A., Abaza M., Sípos P., Szentmihályi K., Fehér E., Szilágyi M.: Biochemical and morphological changes in liver and gallbladder bile of broiler chicken exposed to heavy metals (cadmium, lead, mercury), *Trace Elem. Electrolyt.*, 2002, 19, 42-47.

53. Blázovics A., Abdel Rahman M., Fehér E., Prechl J., Ágoston M., Fehér J.: Lipid peroxidation is a fact in bile, *Mansoura Medical Bulletin*, 1995, 25, 3-4, 119-128.
54. Blázovics A., Abdel Rahman M., Vallent K., Ágoston M., Fehér J.: Bilirubin antioxidant and /or free radical forms in gallstone disease, A theoretical study, 5th IGSC Joint Meeting of Surgeons and Gastroenterologists. Munnich., 1994.
55. Blázovics A., Ambrus D., Mathiasz D., Vereckei A., Fehér J.: A CH 402 antioxidáns hatása patkány agy szubcelluláris frakciók Na⁺ K⁺-ATP-áz és Mg⁺⁺-ATP-áz aktivitásaira aszkorbinsav jelenlétében és hiányában, *Kísérletes Orvostudomány*, 1986, 38, 18-21.
56. Blázovics A., Fehér E., Abdel-Rahman M., Prechl M., Ágoston M., Fehér J.: Free radicals in connection of bile and liver, *Ceska a Slovenska Gastroenterologie*, 1996, 50, 3, 7-13.
57. Blázovics A., Fehér E., Abdel Rahman M., Prechl J., Ágoston M., Fehér J.: Free radicals in connection of bile and liver, *Ces. Slov. Gastroent.*, 1996a, 50, 73-78.
58. Blázovics A., Fehér E., Fehér J.: Role of free radical reactions in experimental hyperlipidemia in the pathomechanism of fatty liver, In: *Free Radicals and Liver*, ed.: G. Csomós and J. Fehér, Springer-Verlag, Berlin, 1992, 98-126.
59. Blázovics A., Fehér E., Fehér J.: Természetes antioxidánsok és szöveti regeneráció (Gyógyhatás és reakciómechanizmus I.), *Fitoterápia*, 1995a, 1, 116-122.
60. Blázovics A. Fehér E., Kéry Á., Petry G., Fehér J.: Liver protecting and lipid lowering effects of *Sempervivum tectorum* in the rats, *Phytother. Res.*, 1993, 7, 98-100.
61. Blázovics A., Fehér J.: Természetes antioxidánsok és szöveti regeneráció (Gyógyhatás és reakciómechanizmus II.), *Fitoterápia*, 1995b, 1, 171-176.
62. Blázovics A., Fehér J.: Sikerek és kudarcok a retinoid terápiában, *Gyógyszereink*, 1996b, 46, 124-129.
63. Blázovics A., Fehér J.: Növényi alapú táplálkozás és gyógynövények szerepe a szervezet redox-homeosztázisában, *Komplementer Medicina*, 2002a, VI, 3, 12-16.
64. Blázovics A., Fehér J.: Az oxidatív stressz és a máj, pp. 50-88, *Hepatológia Szerk.: Fehér J. Lengyel G., Medicina*, 2001.
65. Blázovics A., González-Cabello R., Barta I., Gergely P., Fehér J.: Effect of liver-protecting *Sempervivum tectorum* extract on the immune reactivity of spleen cells in hyperlipidemic rats, *Phytother. Res.*, 1994a, 8, 33-37.
66. Blázovics A., González-Cabello R., Gergely P., Fehér J.: Természetes antioxidánsok és szöveti regeneráció (Gyógyhatás és reakciómechanizmus III.), *Fitoterápia*, 1996b, 1, 12-19.
67. Blázovics A., Györy H., Fehér J.: Orvoslás az Ősi Egyiptomban, *Orvosi Hetilap*. 1999, 140, 26, 1449-1504.
68. Blázovics A., György I., Zsinka A.J.N., Biacs P., Földiák G., Fehér G.: In vitro scavenger effect of dihydroquinoline - type derivates in different free radical generating systems, *Free Rad. Res. Comms.*, 1989a, 6, 4, 217-226.
69. Blázovics A., Horváth É.M., Barta I., Kéry Á., Petri G., Vásárhelyi B., Fehér J.: *Sempervivum tectorum* and liver regeneration, In: *Proc. of the Oxygen free radicals and scavengers in the natural sciences*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1993a, 293-300.
70. Blázovics A., Kéry Á., Fehér E., Prónai L., González-Cabello R., Barta I., Lugasi A., Gergely P., Fehér J.: Natural antioxidants in liver therapy, *Current Topics of Biophysics*, 1997, 20, 14-30,
71. Blázovics A., Kéry A., Petry G., György I., Fehér J.: Effects of flavonoids on tissue regeneration, Oxygen stress and tissue damage, *Akadémiai Kiadó, Budapest*, 1994b, 8-18.

72. Blázovics A., Kéry Á., Fehér E., Prónai L., Renzo-Gonzalez G., Barta I., Lugasi A., Petri G., Fehér J.: Természetes antioxidáns és szöveti regeneráció (Gyógyhatás és reakciómechanizmus), *Fitoterápia*, 1999, IV, 72-79.
73. Blázovics A., Kovács Á., Lugasi A.: A fekete retek élettani hatásai, TMA-TAKI, MÉT 318. Tudományos Kollokvium, Budapest, 2004f, december 16.
74. Blázovics A., Kovács Á., Lugasi A., Hagymási K., Bíró L., Fehér J.: Antioxidant defence in erythrocytes and plasma of patients with active and quiescent Crohn's disease and ulcerative colitis: A chemiluminescent study, *Clin. Chem.*, 1999a, 45, 6, 895-896.
75. Blázovics A., Kovács Á., Lugasi A., Hagymási K., Bíró L., Fehér J.: Total scavenger capacity of erythrocytes and plasma is a good predictive factor in inflammatory bowel diseases, *Curr. Top. Biophys.*, 2000, 24, 19-28.
76. Blázovics A., Lugasi A., Hagymási K., Szentmihályi K., Kéry A.: Natural antioxidants and tissue regeneration, Curative effect and reaction mechanism, *Phytochem. Pharmacol.*, 2002, II. Vol. 8. pp. 93-134, SCI TECH Publishing LLC, Texas, USA 2002.
77. Blázovics A., Lugasi A., Kemény T., Hagymási K., Kéry Á.: Membrane stabilizing effects of natural polyphenols and flavonoids from *Sempervivum tectorum* on hepatic microsomal mixed-function oxidase system in hyperlipidemic rats, *J. Ethnopharm.*, 2000, 73, 479-485.
78. Blázovics A., Lugasi A., Szentmihályi K., Kéry Á.: Reducing power of the natural polyphenols of *Sempervivum tectorum* in vitro and in vivo, *Acta Biol. Szegediensis*, 2003, 47, 1-4, 99-102.
79. Blázovics A., Örsi F., Abdel Rahman M., Sipos P., Vallent K., Fehér J.: Free radical reactions in the pathomechanism of gallstone diseases, *Magy. Berorv. Arch.*, 1997a, 50, 221-223.
80. Blázovics A., Örsi F., Kemény T., Fehér E., Barta I., Fehér J.: Lipids and lipid peroxidation in liver, bile and gallbladder, *Progr. Hepato-Pharmacol.*, 1997b, 2, 103-116. (Falk II. díj)
81. Blázovics A., Örsi F., Sipos P., Fehér J.: Free radical reactions in the bile: experimental and human studies, *Current Topics in Biophysics*, 1998, 22. Suppl. B. 21-26.
82. Blázovics A., Örsi F., Abdel Rahman M., Sipos P., Kemény T., Vallent K., Fehér J.: Szabadgyökös reakciók az epeköbetegségek patomechanizmusában, *Magyar Belorvosi Archivum*, 1997c, 50, 2, 221-223.
83. Blázovics A., Pál J., Zsinka A.J.N., Fehér J.: A silibinin gyökfogó hatásának in vitro vizsgálata, *Kísérletes Orvostudomány*, 1989, 41, 380-386.
84. Blázovics A., Prónai L., Kéry Á., Petri G., J Fehér.: Natural antioxidant extract from *Sempervivum tectorum*, *Phytother. Res.*, 1993b, 7, 95-97.
85. Blázovics A., Rapavi E., Hagymási K., Szentmihályi K., Lugasi A., Balázs A., Then M., Bányai É., Héthelyi É.: Is Medical control of herbal tea consumption necessary? *Acta Horticulturae*, No. 629, ISHS, 2004a, 153-160.
86. Blázovics A., Somogyi A., Lengyel G., Láng I., Fehér J.: Inhibition of lipid peroxidation by dihydroquinoline type antioxidant (CH 402), *Free Rad. Res. Comms.*, 1988a, 4, 109-413.
87. Blázovics A., Somogyi A., Nagy É., Fehér J.: Silibinin kezelés hatása a máj drog-metabolizáló enzimrendszerére kísérletes hyperlipidaemiában, *Kísérletes Orvostudomány*, 1988b, 151-158.
88. Blázovics A., Somogyi A., Vereckei A., Fehér J.: Possible role of free radicals in the pathomechanism of fatty liver in hyperlipidemic rats, In: *Proc. of the 6th Dresden Lipid Symposium, Lipoproteins and Atherosclerosis*, 1988c, 724-727.
89. Blázovics A., Szentmihályi K., Kocsis I., Rapavi E., Stefanovits-Bányai É., Lugasi A.: Beiqishen tea hatása a redox-homeosztázisra „Short term” kísérletben, patkányokban, *Mikroelemek a táplálékláncban*, Szerk. Simon L., Szilágyi M., 2003a, 252-260.

90. Blázovics A., Szentmihályi K., Lugasi A., Balázs A., Hagymási K., Bányai É., Then M., Rapavi E., Héthelyi É.: In vitro analysis of the properties of Beiqishen tea, *Nutrition*, 2003b, 19, 10, 869-875.
91. Blázovics A., Szentmihályi K., Prónai L., Hagymási K., Lugasi A., Kovács Á., Fehér J.: Redox-homeosztázis gyulladásos bélbetegségekben, *Orvosi Hetilap*, 2004, 28, 1459-1466.
92. Blázovics A., Szentmihályi K., Kocsis I., Lugasi A., Héthelyi É., Stefanovits-Bányai É., Bárkovits S., Pintér E., Rapavi E., Székely E., Kurucz T., Pallai Zs.: In vitro, in vivo állatkísérlets és humán modelleken történő vizsgálatok a szöveti redox-státusz meghatározására növényi eredetű hatóanyagok terápiás alkalmazása során, Széchenyi Szimpózium, 1/016. NKFP 2004b.
93. Blázovics A., Szentmihályi K., Rapavi E., Fehér E., Vinkler P.: Accumulation of toxic elements in liver and bile in hyperlipidemy, *Trace Elem. Electrolyt.*, 2003c, 20, 10-16.
94. Blázovics A., Szentmihályi K., Vinkler P., Kovács Á.: Zn overdose may cause disturbance in the iron metabolism, *Trace Elem. Electr.*, 2004c, 21, 4, 240-247.
95. Blázovics A., Szilágyi M., Taba G., Szentmihályi K.: Free radical reactions as compensatory effects of antioxidant treatments, In: *Macro and Trace Elements*, eds. Anke M., Flachowsky G., Kisters K., Müller R. Schäfer U., Seifert M., Stoeppler M.: Schubert Verlag-Leipzig, 1. Auflage 2004, ISBN 3-929526-79-4, ISSN 1430-9637, 2004, 1430-1435.
96. Blázovics A., Szilvás Á., Kovács Á., Pallai Zs., Taba G., Szentmihályi K.: Erythrocyte total scavenger capacity is a good diagnostic parameter for gastrointestinal tumors and inflammatory bowel diseases, *Inflammatory bowel Disease: Translation from Basic Research to Clinical Practice*, Falk Symposium No. 140. Dubrovnik, 2004d.
97. Blázovics A., Szilvás Á., Kovács Á., Tulassay Zs.: Az extrém nagy vörösvértest kemilumineszcencia jóslófaktor vastagbél-tumorkban, *MBT Nagygyűlés*, Budapest, 2004e.
98. Blázovics A., Vereckei A., Cornides Á., Fehér J.: A (+) cyanidanol-3 hatása a patkány agy Na^+ K^+ -ATP-áz és Mg^{++} -ATP-áz aktivitására aszkorbinsav jelenlétében és hiányában, *Kísérletes Orvostudomány*, 1986, 38, 27-30.
99. Blázovics A., Vereckei A., Cornides A., Fehér J.: The effect of (+) cyanidanol-3 on the Na^+K^+ ATP-ase and Mg^{++} ATP-ase activities of the rat brain in the presence and absence of ascorbic acid, *Acta Physiol. Hung.*, 1989a 73, 1, 9-14.
100. Blázovics A., Zsinka Á.J.N., Abdel Rahman M., Fehér E., Ágoston M., Fehér J.: Free radicals in the bile juice, *Z. Gastroenterol.*, Program/Abstracts, 1994, 1, 80.
101. Blois M. S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, 1958, 4617, 1198-1200.
102. Blumberg R.S., Strober W.: Prospects for research in inflammatory bowel disease, *JAMA*, 2001, 285, 643-647.
103. Bognár R., Szabó V., Farkas I.-né: Magyar Szabadalom, 1957, 145, 409.
104. Bonnett R., Davies J.E., Hursthouse M.B.: Structure of bilirubin, *Nature*, 1976, 262, 326-327.
105. Bora P.S., Guruge B.L., Miller D.D., Chaitman B.R., Ruyle M.S.: Purification and characterization of human heart fatty acid ethyl ester synthase/carboxylesterase, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1996, 28, 2027-2032.
106. Borgeat P., Samuelsson B.: Transformation of arachidonic acid and homo-gamma-linoleic acid by rabbit polymorphonuclear leucocytes, *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 7816-7820.
107. Bors W., Heller W., Michel C., Saran M.: Flavonoids as antioxidants: Determination of radical scavenging efficiencies, *Meth. Enzymol.*, 1990, 186, 343-355.

108. Bors W., Heller W., Michel C., Saran M.: Structural principles of flavonoid antioxidants, In: Free radicals and the liver eds. Csomós G., Fehér J. Springer-Verlag, Berlin, 1992.
109. Bors W., Saran M.: Radical scavenging by flavonoid antioxidants, Free Rad. Res. Comms., 1987, 2, 289-294.
110. Boscoboinik D., Szewczyk A., Hensey C., Azzi A.: Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol, Role of protein kinase C, J. Biol. Chem., 1991, 266, 6188-6194.
111. Bosron W.F., Li T.K.: Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases, and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism, Hepatology, 1986, 6, 502-510.
112. Bosron W.F., Lumeng L., Li T.K.: Genetic polymorphism of enzymes of alcohol metabolism and susceptibility to alcoholic liver disease, Mol. Asp. Med., 1988, 10, 147-158.
113. Boxer J.A., Oliver J.M., Spilberg S.O., Allen J.M., Shulman J.D.: Protection of granulocytes by vitamin E in glutathione synthetase deficiency, Eng. J. Med., 1979, 301, 901-905.
114. Böhm K.: Untersuchungen über choleretische Wirkungen einiger Arzneipflanzen, Arzneimittelforschung, 1959, 9, 376-378.
115. Braegger C.P., Nicholls S., Murch S.H., Stephens S., MacDonald T.T.: Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation, Lancet, 1992, 339, 89-91.
116. Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, Nutrition Reviews, 1998, 56, 317-333.
117. Breinholt, V.: Desirable vs. harmful levels of intake of flavonoids and phenolic acids. In: Natural Antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease, (ed.: Kumpulainen, J.T., Salonen, J.T.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999, 93-105.
118. Bremnes L.: Herbs, Dorling Kindersley Ltd. London, (1994). Fűszer- és gyógynövények, Magyar fordítás: Panem Kft és Grafo Kft. 1995.
119. Brillouin L.: Giant molecules in semiconductors, In: Horizons in Biochemistry, eds. Kasha M., Pullman B., Acad. Press. N.Y. 1962.
120. Brito B., Romano E., Soyano H.: Increased LPS-induced TNF levels and death in rabbits with hypercholesterolemic diets, In: 8th. International Congress of Immunology, Abstract 147, Springer – Hungarica, 1992.
121. Broska M., Moniuszko-Jakoniuk M., Jurczuk M., Galazyn-Sidorczuk M., Rogalska J.: Effect of short-term ethanol administration on cadmium retention and bioelement metabolism in rats continuously exposed to cadmium, Alc. Alcohol, 2000, 35, 439-445.
122. Brouillard, R., Cheminat, A.: Flavonoids and plant colour, Prog. Clin. Biol. Res., 1988, 280, 93-106.
123. Brown J.P., Dietrich P.S.: Mutagenicity of plant flavonoids in Salmonella/mammalian microsome test: activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat cecal bacteria and other sources, Mutat. Res., 1979, 66, 223-240.
124. Buffinton G.D., Doe W.F.: Altered ascorbic acid status in the mucosa from inflammatory bowel disease patients, Free Radic. Res., 1995, 22, 131-143.
125. Buffinton G.D., Doe W.F.: Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease, Free Radic. Biol. Med., 1995a, 19, 911-918.
126. Burton G. W., Ingold K.U.: Vitamin E: Application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function, Acc. Chem. Res., 1986, 19, 194-201.
127. But, P.P.H.: Need for correct identification of herbs in herbal poisoning, Lancet. 1993, 341, 637.

128. Butt J.M., Lennard-Jones J.E., Ritchie J.K.: A practical approach to the risk of cancer in inflammatory bowel disease, *Med. Clin. N. Am.*, 1980, 64, 1203-1220.
129. Cadenas E., Packer L.: *Handbook of antioxidants*, Marcel Dekker Inc. New York, US, 1996.
130. Cakman I., Kirchner H., Rink L.: Zinc supplementation reconstitutes the production of interferon-alpha by leucocytes from elderly persons, *J. Interf. Cytokine Res.*, 1997, 17, 469-472.
131. Calabrese V., Renis M., Calderone A., Russo A., Reale S., Barcellona M.L., Rizza T.: Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cellular injury after chronic ethanol administration in rat, *Free Radic. Biol. Med.*, 1998, 24, 1159-1167.
132. Canthafora A., Angelico M., DiBiase A., Piéche U., Bracci F., Attili A.F., Capocaccia L.: Structure of biliary phosphatidylcholine in cholesterol in cholesterol gallstone patients, *Lipids*, 1981, 16, 589-592.
133. Carey M.C.: Formation of cholesterol gallstones, the new paradigms, In: Paumgartner G, Stiehl A, Geroock W: (ed) *Trends in bile acid research*. Dordrecht, 1988, 259-281.
134. Carey M.C., Cahalane M.J.: Whither biliary sludge? *Gastroenterology*, 1988a, 95, 508-523.
135. Carey M.C., Small D.M.: Physical chemistry of cholesterol solubility in bile: relationship to gallstone formation and dissolution in man, *J. Clin. Invest.*, 1978, 61, 998-1026.
136. Caruso C., Candore G., Modica M.A., Bonanno C.T., Sireci G., Dieli F., Salerno A.: Major histocompatibility complex regulation of cytokine production, *J. Interf. Cytokine Res.*, 1996, 16, 983-988.
137. Carver, J.H., Carrano, A.V., MacGregor, J.T.: Genetic effects of the flavonols quercetin, kaempferol, and galangin on Chinese hamster ovary cells in vitro, *Mutat. Res.*, 1983, 113, 45-60.
138. Castrillo A., Diaz-Guerra M.J., Hortelano S., Martin-Sanz P., Bosca L.: Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta-(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages, *Mol. Cell. Biol.*, 2000, 20, 5, 1692-1698.
139. Chan W.: Cellular interaction of vitamin E cytokines and growth factors, *Nut. Res.*, 1996, 16, 427-439.
140. Chandra R.K.: Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again, *Proc. Nutr. Soc.*, 1999, 58, 681-683.
141. Cheeseman K.H., Collins M., Maddix S., Milia A., Proudfoot K., Slater T.F., Burton G.W., Webb A., Ingold K.U.: Lipid peroxidation in generating rat liver, *FEBS-Lett.* 1986, 15, 209, 191-196.
142. Chen C.Y., Huang Y.L., Lin T.H.: Association between oxidative stress and cytokine production in nickel-treated rats, *Arch Biochem. Biophys.* 1998, 356, 127-132.
143. Chin D.T.Y. Stults F.H., Tappel A.L.: Purification and properties soluble glutathione peroxidase of rat lung, *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 445, 558-566.
144. Chouldry M.A., Sayeed M.M.: PGE2 suppress mitogen induced Ca⁺ mobilization in T cells, *Am. J. Physiol.*, 1999, 277, R1741-R1748.
145. Chouldry M.A., Sayeed M.M.: PGE2 mediated inhibition of T-cell p59 (fyn) is independent of cAMP, *Am. J. Physiol.*, 1999a, 277, C302-C309.
146. Chowdhury J.R., Chowdhury N.R.: Conjugation and excretion of bilirubin, *Semin. Liv. Dis.*, 1983, 3, 11-15.
147. Christian J.S., Rege W.R.: Methionine but not taurine, protect against formation of canine pigment gallstones, *J. Surg. Res.*, 1996, 61, 275-281.
148. Christodoulou D.K., Tsianos E.V.: Anemia in inflammatory bowel disease – the role of recombinant human erythropoietin, *Eur. J. Int. Med.*, 2000, 11, 222-227.

149. Chukhlov A.B., Tokalov S.V., Yagunov A.S., Westendorf J., Reincke H., Karbe L.: In vitro suppression of thymocyte apoptosis by metal-rich complex environmental mixtures: potential role of zinc and cadmium excess, *Sci. Total Environ.*, 2001, 281, 153-163.
150. Chung S.W., Kang B.Y., Kim S.H., Pak Y.K., Cho D., Trinchieri G., Kim T.S.: Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor- γ and nuclear factor- κ B, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 32681-32687.
151. Ciska E., Piskula M., Waszczuk K., Kozłowska H.: Glucosinolates in Cruciferous vegetables grown in Poland, In: *Bioactive substances in food of plant origin*. (eds.: Kozłowska H., Fornal J., Zdunczyk Z.). Polish Academy of Science, Olsztyn 1994, 36-39.
152. Clopton D.A., Saltman P.: Copper specific damage in human erythrocytes exposed to oxidative stress, *Biol. Trace. Elem. Res.*, 1997, 56, 231-240.
153. Cohen S., Solovay R.D.: *Gallstones*, Churchill Livingstone, New York, 1985.
154. Coman D. R.: *Cancer Res.*, 1944, 4, 625-629, In: Gervay J.: *Szent-Györgyi Albert: Az élő anyag állapota, Gyorsuló idő, Magvető Kiadó, Budapest*, 1983.
155. Conquer J.A., Maiani G., Azzini E., Raguzzini A., Holub B.J.: Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects, *J. Nutr.*, 1998, 128, 593-597.
156. Cook N.C., Samman S.: Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutritional Biochem.*, 1996, 7, 66-76.
157. Cooke M.S., Evans M.D., Herbert K.E., Lunec J.: Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: source significance and supplements, *Free Radic. Res.*, 2000, 32, 381-397.
158. Cooke M.S., Evans M.D., Mistry N., Lunec J.: Role of dietary antioxidants in the prevention of in vivo oxidative DNA damage, *Nut. Res. Rev.*, 2002, 15, 19-41.
159. Cosme R., Lublin D., Takafuji V., Lynch K., Roche J.K.: Prostanoids in human colonic mucosa: effects of inflammation on PGE2 receptor expression, *Human Immunology*, 2000, 61, 684-696.
160. Cronstein B.N., Weissman G.: Targets for antiinflammatory drugs, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1995, 35, 449-462.
161. Curtiss L.K., Edginton T.S.: Regulatory serum lipoproteins regulation of lymphocyte stimulation by a species of low density lipoprotein, *J. Immunol.*, 1976, 118, 1452-1458.
162. Curtiss L.K., Edginton T.S.: Effect of LDL-In, a normal immunoregulatory human serum low density lipoprotein, on the interaction of macrophages with lymphocytes proliferating in response to mitogen and allogenic stimulation, *J. Immunol.*, 1977, 118, 1966-1970.
163. Czauderna M., Rochalska M.: Interaction between Se and Cr and distribution of Zn, Rb, Co, and Fe in mice given chromate ions and selenium compounds, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 1989, 134, 383-392.
164. Czinner E.: *A Helichrysum arenarium (L.) Moench virágzatának bioaktív anyagai és antioxidáns hatása*, Ph.D. Tézisek 2003.
165. Czinner E., Hagymási K., Blázovics A., Kéry Á., Szőke É., Lemberkovics É.: In vitro antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* L. Moench, *J. Ethnopharmacol.*, 2000, 73, 437-443.
166. Czinner E., Hagymási K., Blázovics A., Kéry Á., Szőke É., Lemberkovics É.: The in vitro effect of *Helichrysum flos* on microsomal lipid peroxidation, *J. Ethnopharmacol.*, 2001, 77, 1, 31-35.
167. Czinner E., Lemberkovics É., Kéry Á., Hagymási K., Blázovics A., Lugasi A., Szőke É.: Biologically active components of *Helichrysum arenarium* L., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinetics*, 1999, 24, 4, 309-313.

168. Cseh K.: Cytokinek szerepe a gastroenterológiai megbetegedésekben, Magyar Belorvosi Archivum, 1993, 46, 26-31.
169. Dalekos G.N., Ringstad J., Savaidis I., Seferiadis K.I., Tsianos E.V.: Zinc, copper and immunological markers in the circulation of well nourished patients with ulcerative colitis, Eur. J. Gastroent. Hepatol., 1998, 10, 331- 337.
170. Dam H., Kruse I., Prange I., Kallehauge H.R., Fenger H.J., Krogh-Jensen M.: Studies on human bile III. Composition of duodenal bile from healthy young volunteers compared with composition of bladder bile from surgical patients with and without uncomplicated gallstone disease, Z. Ernährungswiss., 1971, 10, 160-177.
171. Dan L., Laposata M.: Ethyl palmitate and ethyl oleate are the predominant fatty acid ethyl esters in the blood after ethanol ingestion and their synthesis is differentially influenced by the extracellular concentrations of their corresponding fatty acids, Alcohol Clin. Exp. Res., 1997, 21, 286-292.
172. Das K.M., Dasgupta A., Mandal A., Geng X.: Autoimmunity to cytoskeletal protein tropomyosin, A clue to the pathogenetic mechanism for ulcerative colitis, J. Immunol., 1993, 150, 2487-2493.
173. Das K.M., Dubin R., Nagai T.: Isolation and characterization of colonic tissue-bound antibodies from patients with idiopathic ulcerative colitis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, 75, 4528-4532.
174. Debacker V., Schiettecatte L.S., Jauniaux T., Bouquegneau J.M.: Influence of age, sex and body condition on zinc, copper, cadmium and metallothioneins in common guillemots (*Uria* algae) stranded at Belgian coast, Mar. Environ. Res., 2001, 52, 427-444.
175. Degrell I., Molnar G., Molnar L., Kovacz M.: The effect of alcohol and alcohol withdrawal therapy on the concentration of carbohydrate products of metabolism and electrolytes (Na, K, Mg, Cl) in the blood and cerebrospinal fluid-changes in the oxidation-reduction in the brain, Psychiatr. Neurol. Med. Psychol. Leipz., 1980, 32, 723-730.
176. Delerive P., Furman C., Teissier E., Fruchart J., Duriez P., Staels B.: Oxidized phospholipids activate PPARalpha in a phospholipase A2-dependent manner, FEBS Lett., 2000, 7, 34-38.
177. Deliconstantinos G., Ramantani G.: Alterations in the activities of hepatic plasma-membrane and microsomal enzymes during liver regeneration, Biochem J., 1983, 15, 445-452.
178. Deutsches Arzneibuch (DAB 10), Amtliche Ausgabe, Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, Frankfurt a.m. / Eschborn: Govi-Verlag GmbH, 1996.
179. Devaray S., Li D., Jialal I.: The effect of alpha-tokopherol supplementation of monocyte function, Decreased lipid oxidation, interleukin-1 beta secretion, and monocyte adhesion to endothelium, J. Clin. Invest., 1996, 98, 756-763.
180. de Whalley, C. V., Rankin, S. M., Holut, J. R. S., Jessup W., Leake DS.: Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages, Biochem. Pharmacol., 1990. 39. 1743-1750.
181. Dézsi Cs.A., Szeness Á.: 100 év orvosi-életteni Nobel-díjasai, Medicina, 2001
182. Dichi I., Frenhane P., Dichi JB., Correa C.R., Angeleli A.Y., Bicudo M.H., Rodrigues M.A., Victoria C.R., Burini R.C.: Comparison of omega-3 fatty acids and sulfasalazine in ulcerative colitis, Nutrition, 2000, 16, 87-90.
183. Dietary Supplement Health and Education, USA, 1994.
184. Dinarello C.A.: Biology of interleukin-1, FASEB J., 1989, 2, 108.
185. Dinarello L.A., Endres S., Meydani S.N., Meydani M., Hellerstein M.K.: Interleukin-1, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1990, 587, 332-337.
186. Dinya E.: Biometria az orvosi gyakorlatban, Medicina 2001, 1-483.

187. Dixon J., Bhathal S.O., Brien P.: Nonalcoholic fatty liver disease: Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese, *Gastroenterology*, 2001, 121, 91-100.
188. Djujić I, Protić S, Krivokapić Z, Jozanov-Stankov O.: Colon cancer prevention by selenomethionine, 4th International Symposium, Proceedings Book., Athens, 2003.
189. D'Odorico A., Bortolan S., Cardin R., D'Inca R., Martines D., Ferronat Sturniolo GC.: Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease, *Scand. J. Gastroenterol.*, 2001, 36, 1289-1294.
190. Dohi T., Fujihashi K., Kiyono H., Elson C.O., McGhee J.R.: Mice deficient in Th-1 and Th2-type cytokines develop distinct forms of hapten-induced colitis, *Gastroenterology*, 2000, 119, 724-733.
191. Dominicus D.A.R., Gunshin H., Ariizumi M.: Effect of toluene inhalation on the liver and kidney trace element concentration levels in male Wistar rats, *Nutr. Res.*, 1992, 12, 419-426.
192. DRI, Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, zinc, Food and Nutritional Board, Institute of Medicine, National Academic Press, Boston, 2002, 1-800.
193. Dubois R.N.: Review article: Cyclooxygenase a target for colon cancer prevention, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2000, 14, 64-74.
194. Duerr R.H., Targan S.R., Landers C.J., Sutherland L.R., Shanahan F.: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis, Comparison with other colitides/diarrheal illnesses, *Gastroenterology*, 1991, 100, 1590-1596.
195. Dunnick J., Hailey, J. R.: Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1992, 19, 423-431. Dupont I, Lucas D, Clot P, Menez C, Albano E.: Cytochrome P4502E1 inducibility and hydroxyethyl radical formation among alcoholics, *J. Hepatol.*, 1998, 28, 564-71.
196. Dupont I., Lucas D., Clot P., Ménez C., Albano E.: Cytochrome P4502E1 inducibility and hydroxyethyl radical formation among alcoholics, *J. Hepatology.*, 1998, 28, 4, 564-571.
197. Dworschák E., Lugasi A., Blázovics A.: Antioxidáns vitaminok egészségvédő hatása az újabb emberi megfigyelések tükrében, *Fitoterápia*, 1999, IV, 3-7.
198. Eder K., Kirchgessner K.: Zinc deficiency and concentrations of lipids in plasma of rats. *Trace Elem. Electr.*, 1994, 13, 60-65.
199. Eder I.M., Miquel J.F., Jüngst D., Paumgartner G, von Ritter C.: Reactive oxygen metabolites promote cholesterol crystal formation in model bile: role of lipid peroxidation, *Free Rad. Biol. Med.*, 1996, 20, 743-749.
200. Edwards, J. M., Raffaut, R.F., LeQuesne, P.W.: Antineoplastic activity and citotoxicity of flavones, isoflavones and flavanones, *J. Nat. Prod.*, 1979, 42, 85-91.
201. Elek G., Rockenbauer A., Kovács L., Bálint G.: Free radical signal of bile pigment in paraffin embedded liver tissue, *Histochemistry*, 1983, 79, 405-414.
202. Ellman G.L., Lysko H.: Disulfide and sulfhydryl compounds in TCA extracts of human blood plasma, *J. Lab. Clin. Med.*, 1967, 70, 518-527.
203. Eloesser W., Herrmann K.: Flavonols and flavones of vegetables. V. Flavonols and flavones of root vegetables, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1975, 159, 265-270.
204. Ernster L., Forsmark-André P.: An endogenous antioxidant in aerobic organisms, *Clin. Investig.*, 1993, 71, S60-S65.
205. Estabrook R.W., Werringloer J., Peterson J.A.: In: *Xenobiotic Metabolism*, (Paulson, G.D., Frear, D.S., and Marks, E.P., eds.) 1979, 149-179, American Chemical Society, Washington, D.C. "The Use of Animal Subcellular Fractions to Study Type I Metabolism of Xenobiotics."

206. Esteve-Comas M., Ramirez M., Fernandez-Banares F., Abad-Lacruz A., Gil A., Cabre E., Gonzalez-Huix F., Moreno J., Humbert. P., Guilera M., et al.: Plasma polyunsaturated fatty acid pattern in active inflammatory bowel disease, *Gut*, 1992, 33, 1365-1369.
207. Estrov Z., Manna S.K., Harris D., Van-Elihu Q., Estey H., Kantarjian H.M., Talpaz M., Aggarwal B.B.: Phenylarizine oxide bloks interleukin-1 beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kB, inhibits proliferation, and induces apoptosis of acute myelogenous leukemia cells, *Blood*, 1999, 94, 2844-2853.
208. Failla M.L.: Considerations for determining optimal nutrition for copper, zink, manganese and molybdenum, *Proceedings of the Nutrition Society*, 1999, 58, 497-505.
209. Falus A.: A cytokinek szerepe a máj akut fázis válaszában szabályozásában, *Magyar Belorvosi Archivum*, 1993, 1, 23-25.
210. Farrell R.J., LaMont J.T.: Microbial factors in inflammatory bowel disease, *Gastroenterol. Clin. North. Am.*, 2000, 31, 41-62.
211. Fehér E., Blázovics A., Horváth É.M., Kéry Á., Petry G., Fehér J.: Effect of *Sempervivum tectorum* extract in the experimental hyperlipidemia and alcoholism, A histoloical study in the liver and jejunum, In: *Role of Free Radicals in Biological Systems*, ed.: J. Fehér, A. Blázovics, B. Matkovics, M. Mézes, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1993, 45-57.
212. Fehér J., Blázovics A., Cornides A., Vereckei A.: Effect of (+)-cyanidanol-3 on rat brain lipid peroxidation, *Br. J. exp. Path.*, 1985, 66, 161-164.
213. Fehér J., Blázovics A., Gonzalez-Cabello R., Horváth M.É., Gergely P.: Effects of silibinin and vitamin-E on lipid peroxidation and cellular immunoreactivity in experimentally induced fatty liver of rats, *Med. Sci. Monit.*, 1996, 2, 397-403.
214. Fehér J., Blázovics A., Lengyel G.: Ubikinon és más gyökfogók hatása oxidatív stressz okozta károsodásokban, *Orvosi Hetilap*, 2002, 143, 19, 1027-1031.
215. Fehér J. Blázovics A., Lengyel G.: Toxic liver diseases with intrahepatic cholestasis, *Progress in Hepato-Gastroenterol.*, 1997a, 2, 19-25.
216. Fehér J., Blázovics A., Lengyel G.: Oxidative stress and its prevention in toxic liver lesions, An overview, *Biochemical pharmacology as an approach to gastrointestinal diseases*, eds. T.S. Garginella, Gy. Mózsik, K.D. Rainsford. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, London, 225-237, 1996a.
217. Fehér J., Blázovics A., Somogyi A., Lengyel G.: Az oxidatív stressz szerepe és a szabadgyökfogók preventív hatása arteriosclerosisban, *Orvosi Hetilap*, 1997b, 138, 36. 2283-2289.
218. Fehér J., Chiara. G., Vallent K., Deák Gy., Blázovics A., Gergely P., Kaneko Y.: Effect of lentinan of superoxide dismutase enzyme activity in vitro, *Immunopharm. Immunotoxicol.*, 1989, 11, 1, 54-61.
219. Fehér J., Csomós G., Verckei A.: *Free radical reactions in medicine*, Springer Verlag, 1987.
220. Fehér J., Hagymási K.: A nem alkoholos steatohepatitis kezelése, *Orvosi Hetilap*, 2004, 145, 631-634.
221. Fehér J., Kiss Á., Blázovics A., Szondy É., Toncsev H., Mathiasz D., Gerő S.: Hypolipaemic effect and inhibition of lipid peroxidation with glunicate in rats treated with atherogenic diet, *Drug. Exp. Clin. Res.*, 1985, 11, 413- 419.
222. Fehér J., Láng I., Nékám K., Csomós G., Müzes Gy., Deák Gy.: Effect of silibinin on the activity and expression of superoxid dismutase (SOD) in lymphocytes from patients with chronic alcoholic liver diseases, *Free Rad. Res. Comms.*, 1987a, 3, 373-376.

223. Fehér J., Lengyel G.: A new approach to drug therapy in non-alcoholic steatohepatitis (NASH), *J. Int. Med. Res.*, 2003, 31, 537-551.
224. Fehér J., Lengyel G., Blázovics A.: Antioxidáns kezelés jelentősége a mindennapi gyakorlatban, *Háziorvosi Továbbképző Szemle*, 2004a, 9, 487-491.
225. Fehér J., Lengyel G., Blázovics A.: Antioxidánsok, nyomelemek a betegségek megelőzésében. *Magyar Sporttudományi Szemle*, 2002, 2, 32-36.
226. Fehér J., Lengyel G., Blázovics A.: Oxidative stress in the liver and biliary tract diseases, *Scand. J. Gastroenterol.*, 33. Suppl., 1998, 228-238.
227. Fejes Sz.: *Anthriscus cerefolium* és *Petroselinum crispum* antioxidáns hatása és hatóanyagai, Ph.D. Tézisek, 2000.
228. Fejes Sz., Blázovics A., Lemberkovics É., Petri G., Szőke É., Kéry Á.: Free radical scavenging and membrane protective effects of methanol extracts from *Anthriscus cerefolium crispum* (Mill.) Nym. ex. A.W. Hill., *Phytother. Res.*, 2000a, 14, 362-364.
229. Fejes Sz., Blázovics A., Lugasi A., Lemberkovics É., Petri G., Kéry Á.: In vitro antioxidant activity of *Anthriscus cerefolium* L. (Hoffm.), *J. Ethnopharmacol.*, 2000b, 69, 259-265.
230. Fejes Sz., Blázovics A., Lugasi A., Lemberkovics É., Petri G., Kéry Á.: Free radical scavenging and membrane protecting effect of methanol extracted fraction of Parsley, *Acta Aliment. Hung.*, 2000c, 29, 81-87.
231. Fejes Sz., Kéry Á., Blázovics A., Lugasi A., Lemberkovics É., Petri G.: *Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex A.W. Hill. in vitro antioxidáns hatásának vizsgálata, *Acta Pharmaceut. Hung.*, 1998, 68, 150-156.
232. Fejes Sz., Lemberkovics É., Balázs A., Apáti P., Kristó T. Sz., Szőke É., Kéry Á., Blázovics A.: Antioxidant activity of different compounds from *Anthriscus cerefolium* L. (Hoffm.), *Proceedings of the International conference on Medicinal and Aromatic Plants, Part II.* eds. Szőke É., Máté I., Blunden G., Kéry Á., 2003, 191-198.
233. Feltelius N., Hallgren R., Lindh O.: Redistribution of cellular mineral and trace element stores in HLA-B27 positive relatives of patients with ankylosing spondylitis a marker of hidden, *J. of Rheumatology*, 1988, 15, 308-314.
234. Fenwick G.R., Heaney R.K., Mullin W.J.: Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1983, 18, 123-201.
235. Fiebrich F., Koch H.: Silymarin, an inhibitor of prostaglandin synthetase, *Experienta*, 1979, 35, 1550-1520.
236. Finkelstein J.D., Martin J.J.: Methionine metabolism in mammals: Adaptation to methionine excess, *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 1582-1587.
237. Fiorentino D.E., Zlotnic A., Masman T.R., TR, Howard, M., O'Garra, A.: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages, *J. Immunol.*, 1991, 147, 3815-3822.
238. Fisher R.S., Stelzer F., Rock E., Malmud L.S.: Altered gallbladder emptying in patients with gallstones, *Dig. Dis. Sci.*, 1982, 27, 1019-1024.
239. Fong L.G., Fong T.A., Cooper A.D.: Inhibition of lipopolysaccharide-induced interleukin-1 beta mRNA expression in mouse macrophages by oxidized low density lipoprotein, *J. Lipid Res.*, 1991, 32, 1899-1910.
240. Formica, J.V., Regelson, W.: Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids, *Food Chem. Toxicol.*, 1995, 33, 1061-1080.
241. Foster S., Chongxi Y.: *Herbal Emissaries: Bringing Chinese Herbs to the West* Rochester, V.T. Healing Arts Press, 1992, 27-33.

242. Fraenkel E., Lazúrová I., Fehér J.: A lipidperoxidáció szerepe a nem alkoholos steatohepatitis kialakulásában, *Orvosi Hetilap*, 2004, 145, 611-618.
243. Frankel E.N.: Review, Recent advances in lipid oxidation, *J. Sci. Food Agric.*, 1991, 54, 495-511.
244. Frankel E.N., Waterhouse A.L., Kinsella J.E.: Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol, *Lancet*, 1993, 341, 1103-1104.
245. Fraser A.G.: Pharmacokinetic interactions between alcohol and other drugs, *Clin. Pharmacokinet.*, 1997, 33, 79-90.
246. Fridovich I.: Overview: Biological spectra of O₂, *Meth. Enzymol.*, 1984, 105, 59-61.
247. Friedhandler T.M., Davidson J.S., Shaffer E.A.: Defective gallbladder contractility in the ground squirrel and prairie dog during the early stages of cholesterol gallstone formation, *Gastroenterology.*, 1983, 85, 830-836.
248. Fuhrer D.: A nuclear receptor in thyroid malignancy: is PAX8/PPAR- γ the Holy Grail of follicular thyroid cancer? *Eur. J. Endocrinol.*, 2001, 144, 453-456.
249. Fujita Y., Ueda I., Morimoto Y., Nakashima M., Hatano T., Okuda T.: Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids, II. *Yakugaku Zasshi* 1988, 108, 129-135.
250. Fukunishi K.: Effects of superoxide dismutase on liver regeneration in rats, *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 1991, 92, 339-345.
251. Gallinger S., Harvey PRC, Strasberg S.M.: Evidence for a nucleation defect in bile from gallstone patients. *Hepatology*, 1984, 4, 177S-179S.
252. Gartner, E., Marschall, P.S., Filandrinos, D., Potek, A.S., Smith, T.M.: Complications resulting from the use of Chinese herbal medications containing undeclared prescription drugs, *Arthritis Rheum.*, 1993, 38, 614-617.
253. Gebhardt R.. Differential inhibition of protein kinases and matrix metalloproteinases by natural flavonoids, a general survey. Inaugural COST 926 Conference European Workshop, Cellular responses to bioactive plant compounds—implications for human health, Budapest, 2004.
254. Geerling B.J., Badart-Smook A., van Deursen C., van Houwelingen A.C., Russel M.G., Stockbrugger R.W., Brummer R.J.: Nutritional supplementation with N-3 fatty acids and antioxidants in patients with Crohn's disease in remission: effects on antioxidant status and fatty acid profile, *Inflamm. Bowel Dis.*, 2000, 6, 77-84.
255. Geerling B.J., Stockbrugger R.W., Brummer R.J.: Nutrition and inflammatory bowel disease: an update, *Scand. J. Gastroenterol.*, Suppl. 1999, 230, 95-105.
256. Geiger J.M., Bandin M., Saurat J.H.: Teratogenic risk with etretinate and acitretin treatment, *Dermatology*, 1994, 182, 109-116.
257. Gelagutashvili E.S., Mikeladze I.V., Sapojnikova N.A.: Binding and the nature of Co(II), Ni(II), Zn(II) ion interaction with nucleosomes, *J. Inorg. Biochem.*, 1997, 65, 159-161.
258. Gergely J., Erdélyi A.: *Immunbiológia, Medicina*, 2000.
259. Gerő S., Blázovics A., Szondy É., Fehér J.: The effect of antioxidants in experimental atherosclerosis, *Annual Physiology and Biochemistry*, edited by S. Karger A.G., 1985. In: *Proc. of the 44th Meeting of EAG, Montreal*, 1985.
260. Ghos S., Meister D.: Osteopenia in inflammatory bowel disease, *Res. Klein. Forums.* 2000, 22, 159-170.
261. Goebeler M., Meinardus-Hager G., Roth J., Goerd S., Sorg C.: Nickel chloride and cobalt chloride, two common contact senzitzers, directly induce expression of intracellular adhesion molecule-1

- (ICAM-1) vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and endothelial leucocyte adhesion molecule (ELAM-1) by endothelial cells, *J. Invest. Dermatol.*, 1993, 100, 759-765.
262. Goeptar A.R., Scheerens, H., Vermeulen Nico P.E.: Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450, *Crit. Rev. Toxicol.*, 1995, 25, 25-65.
 263. Gokhale R., Favas M.J., Karrison T. Sutton M.M., Rich B., Kirschner B.S.: Bone mineral density assessment in children with inflammatory bowel disease, *Gastroenterology*, 1999, 114, 902-911.
 264. Goncalves E., Almeida L.M., Dinis T.C.P.: Antioxidant activity of 5-aminosalicylic acid against lipid peroxidation in the presence of vitamins C and E, *Int. J. Pharm.*, 1998, 172, 219-228.
 265. Gonzalez-Cabello R., Blázovics A., Horváth É.M., Müzes Gy., Gergely P., Fehér J.: Effect of vitamin E on the immunoreactivity of spleen cells in hyperlipidemic rats, *Acta Med. Hung.*, 1992/1993, 49, 101-108.
 266. Gonzalez-Cabello, R., Perl, A., Kalmár, L., Gergely, P.: Short term stimulation of lymphocyte proliferation by indomethacin in vitro and in vivo, *Acta Phys. Hung.*, 1987, 70, 1, 25-30.
 267. Goodwin J.S.: Are prostaglandins proinflammatory, antiinflammatory, both or neither, *J. Rheumatol.*, 1991, (Suppl. 28) 18, 26-29.
 268. Groen A.K., Drapers J.A.G., Tytgat G.N.J.: Cholesterol nucleation and gallstone formation, *J. Hepatol.*, 1988, 6, 383-387.
 269. Groenbaeck M., Deis A., Sorensen T. I. A. Becker U., Schnohr P., Jensen G.: Mortality associated with moderate intakes of wine, beer or spirits, *Br. Med. J.*, 1995, 310, 1165-1169.
 270. Grove, J., Daly, A.K., Bassendine, M.F., Gilvarry, E., Day, C.P.: Interleukin-10 promoter region polymorphisms and susceptibility to advanced alcoholic liver disease, *Gut*, 2000, 46, 4, 540-545.
 271. Grunfeld C., Verdier J.A., Neese R., Moser A.H., Feingold K.R.: Mechanisms by which tumor necrosis factor stimulates hepatic fatty acid synthesis in vivo, *J. Lipid Res.*, 1988, 29, 1327-1335.
 272. Gysin R., Azzi A., Visarius T.: Gamma-tokoferol inhibits human cancer cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins, *Faseb* 2002, 16, 1952-1954.
 273. György I., Antus S., Blázovics A., Földiák G.: Substituent effects in the free radical reactions of silybin radiation-induced oxidation of the flavonoid at neutral pH, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1992, 61, 5, 603-609.
 274. György I., Blázovics A., Fehér J., Földiák G.: Reactions of inorganic free radicals with liver protecting drugs, *Radiat. Phys. Chem.*, 1990, 36, 165-167.
 275. Győry H., Blázovics A.: „...amit...Su készített magának...” Ősi egyiptomi receptek, *Fitoterápia*, 2000, 99/4, 98-103.
 276. Győry H.: „Tölts be százöt évét a Földön és tagjaid maradjanak erősek” *Kriterion Kiadó, Kolozsvár*, 2003.
 277. Habtemariam S.: Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha in L-929 tumor cells, *J. Nat. Prod.*, 1997, 60, 775-778.
 278. Hacket, A. M.: The metabolism of flavonoid compounds in mammals, *Prog. Clin. Biol. Res.* 1986, 213. 177-194.
 279. Haddad J.J.: Glutathione depletion is associated with augmenting a pro-inflammatory signal: Evidence for an antioxidant/prooxidant mechanism regulating cytokines in the alveolar epithelium, *Cytokines, Cell. Mol. Ther.*, 2000, 6, 177-187.
 280. Haddad J.J.: Oxygen-sensitive pro-inflammatory cytokines, apoptosis signaling and redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology, *Cytokines, Cell. Mol. Ther.*, 2002, 7, 1-14.

281. Hadfield M.G., Adera T., Smith B., Fortner-Burton C.A., Gibb, R.D., Mumaw, V.: Human brain tumors and exposure to metal and non-metal elements: a case control study, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 1998, 17, 1-9.
282. Hagman J., Weiler I., Waelti E.: Effects of low density lipoproteins on lymphocyte stimulation, *FEBS Lett.*, 1979, 97, 230-232.
283. Hagymási K.: A máj redox-homeosztázisának tanulmányozása kísérletes és humán vizsgálatokban: antioxidáns kezelés – antioxidáns betegség, Ph.D. Tézisek, Budapest, 2002
284. Hagymási K., Blázovics A.: Antioxidánsok a májvédelemben, *Orvosi Hetilap*, 2004, 145, 27, 1421-1425.
285. Hagymási K., Blázovics A., Fehér J., Lugasi A., Kristó Sz.T., Kéry Á.: The in vitro effect of Dandelion's antioxidants on microsomal lipid peroxidation, *Phytother. Res.*, 2000, 14, 43-44,
286. Hagymási K., Blázovics A., Kocsis I., Fehér J.: Effect of metadoxine-liver protecting agent on short-term extrahepatic cholestasis, *Current Topics in Biophysics*, 2000a, 24, 2, 69-73.
287. Hagymási K., Blázovics A., Kristó T.Sz., Fehér J., Kéry Á.: *Taraxacum officinale*- az orvos szemével, *Fitoterápia*, 1999, 4, 2, 51-56.
288. Hagymási K., Blázovics A., Lengyel G., Kocsis I., Fehér J.: Oxidative damage in alcoholic liver disease, *Eur. J. Gastroent. Hepatol.*, 2001, 13, 49-53.
289. Hagymási K., Blázovics A., Lengyel G., Lugasi A., Fehér J.: A máj redox- homeosztázisának tanulmányozása kísérletes és humán vizsgálatokban, *Acta Pharmaceutica Hung.*, 2004a, 74, 51-63.. ("Alapítvány a Magyar Gyógyszerkutatásért" különdíj)
290. Hagymási K., Blázovics A., Lugasi A., Kristó Sz.T., Fehér J., Kéry A.: In vitro antioxidant evaluation of dandelion (*Taraxacum officinale* Web.) water extract, *Acta Aliment. Hung.*, 2000b, 29, 1-7.
291. Hagymási K., Fehér J. és a multicentrikus munkacsoport (Blázovics Anna): A silymarin hatása és tolerálhatósága idült májbetegségekben, *Medicus Universalism XXXIII.*, 2000c, 13, 179-182.
292. Hagymási K., Lengyel G., Nagy E., Pallai Zs., Kocsis I., Fehér J., Tulassay Zs., Blázovics A.: Impaired antioxidant status in non-organ specific autoantibody positive patients with nonalcoholic fatty liver disease, *Scan. J. Gastroenterol.*, 2004b (elküldve)
293. Hagymási K., Kocsis I., Lugasi A., Fehér J., Blázovics A.: Extrahepatic biliary obstruction: can silymarin protect liver function? *Phytother. Res.*, 2001a, 15, 1-3.
294. Halliwell B.: The antioxidant paradox, *Lancet*, 2000, 355, 1179-1180.
295. Halstensen T.S., Das K.M., Brandtzaeg P.: Epithelial deposits of immunoglobulin G1 and activated complement colocalise with the M(r)40 kD putative autoantigen in ulcerative colitis, *Gut*, 1993, 34, 650-657.
296. Hamilton T.A., Major J.A., Armstrong D., Tebo J.M.: Oxidized LDL modulates activation of NFkappaB in mononuclear phagocytes by altering the degradation of IkappaBs, *J. Leukoc. Biol.*, 1998, 64, 667-674.
297. Hansel R.: Traditionelle Reizkörpertheraphie, gesehen als Immunstimulation, *Deutsche Apotheker. Z.* 1984, 124, 54-59.
298. Harada S.: Genetic polymorphism of aldehyde dehydrogenase and its physiological significance to alcohol metabolism, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1990, 344, 289-294.
299. Haraszti E.: Mérgező Növények – Növényi Mérgezések. Ördögceérna, *Lycium barbarum* L. halimifolium, *Mezőgazdasági Kiadó*, Budapest. 1985, 124-125.
300. Hardigree A.A., Epler J.L.: Comparative mutagenesis of plant flavonoids in microbial system, *Mutat. Res.*, 1978, 58, 231-239.

301. Harris S.G., Padilla J., Koumas L., Ray D., Phipps R.P.: Prostaglandins modulators of immunity, *Trends in Immunol.*, 2002, 23, 3144-3150.
302. Harrison K.M.: World trends driving horticulture expansion in emerging economies, XXVI. International Horticultural Congress and Exhibition, IHC 2002, S15-024, 406.
303. Hartwig, A.: Carcinogenicity of metal compounds: Possible role of DNA repair inhibition, *Toxicol. Lett.*, 1998, 102-103, 235.
304. Hartwig A., Mullenders L.H.F., Schlepegrell R., Kasten U., Beyersmann, D.: Nickel(II) interferes with the incision step in nucleotide excision repair in mammalian cells, *Cancer Res.*, 1994, 54, 4045.
305. Hatano T., Kagawa H., Yasuhara T., Okuda T.: Two new flavonoids and other constituents in licore root: their relative astringency and radical scavenging effects, *Chem. Pharm. Bull.*, 1988, 36, 2090-2097.
306. Havsteen B.: Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency, *Biochem. Pharmacol.*, 1983, 32, 1141-1148.
307. Hawkey C.J., Mahida Y.R., Hawthorne A.B.: Therapeutic interventions in gastrointestinal disease based on an understanding of inflammatory mediators, *Agents Actions*, 1992, Spec. No. C22-C26.
308. Hayat, L.: Cations in malignant and benign brain tumors, *J. Environ. Sci. Health. Part. A, Environ. Sci. Eng. Toxic. Hazard Subst. Control.*, 1996, 31, 1831-1840.
309. Head K.A., Jurenka J.S.: Inflammatory Bowel Disease Part I. Ulcerativ colitis – pathophysiology and conventional and alternative treatment options, *Alternative Medicine, Review*, 2003, 8, 247-383,
310. Heide L., Bögl W.: The identification of irradiated dried foodstuffs by luminescence measurements, *Food Lab. Newsletter*, 1986, 5, 21-23.
311. Henry C.: New variant of cyclooxygenase may explain acetaminophen mechanism, *Biochemistry*, 2002, 80, 38, 16.
312. Herbert V.: Viewpoints does mega-C do more good than harm, or more harm than good? *Nutr. Today*, 1993, 28, 126-133.
313. Herrman, K.: On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1988, 186, 1-5.
314. Hertervig E., Nilsson A., Seidegard J.: The expression of glutathione transferase mu in patients with inflammatory bowel disease, *Scand. J. Gastroenterol.*, 1994, 29, 729-735.
315. Hertog M.G.L., Hollman P.C.H.: Potential health effect of the dietary flavonol quercetin, *European J. Clin. Nutrition*, 1998, 50, 63-71.
316. Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Katan M.B.: Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40, 2379-2383.
317. Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., van de Prutte B.: Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices, *J. Agric. Food Chem.*, 1993, 41, 1242-1246.
318. Héthelyi É., Szarka Sz., Antal I., Blázovics A., Galambosi B., Lemberkovics É., Szőke É.: *Gentiana lutea* L. fitokémiai- és biokémiai vizsgálata, *Olaj, Szappan, Kozmetika*, 2004, 53, 5, 204-211.
319. Héthelyi É., Szabó L., Rapavi E., Domokos J., Blázovics A.: Tényeken alapuló orvoslás a fitoterápiában, *Olaj, Szappan, Kozmetika*, 2001, 50, 2, 67-75.
320. Higinbotham, K.G., Rice, J.M., Diwan, B.A., Kasprzak, K.S., Reed, C.D., Perantoni, A.O.: GGT to GTT transversions in codon 12 of the K-ras onco gene in rat renal sarcomas induced with nickel subsulfide or nickel subsulfide/iron are consistent with oxidative damage to DNA, *Cancer. Res.*, 1992, 52, 47-51.

321. Hodnick W.F., Kung F.S., Roettger W.J., Bohmont C.W., Pardini R.S.: Inhibition of mitochondrial respiratory and production of toxic oxygen radicals by flavonoids: a structure activity study, *Biochem. Pharmacol.*, 1986, 35, 2345-2354.
322. Hogezaand R.A., Verspaget H.W.: Selective immunomodulation in patients with inflammatory bowel disease-future therapy or reality? *Netherlands J. Med.*, 1996, 48, 64-67.
323. Holan K.R., Holzbach R.T., Hermann R.E., Cooperman A.M., Claffey W.J.: Nucleation time: a key factor in the pathogenesis of cholesterol gallstone disease, *Gastroenterology*, 1979, 77, 611-617.
324. Hollman P.C.H.: Bioavailability of flavonoids, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1997, 51, S66-S69.
325. Hollman P.C.H., de Vries J.H.M., van Leeuwen S.D., Mengelers M.J., Katan M.B.: Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995, 62, 1276-1282.
326. Hollman P.C.H., van den Gaag M., Mengelers M.J.B., van Trijp J.M.P., De Vries J.H.M., Katan M.B.: Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man, *Free Rad. Biol. Med.*, 1996, 21, 703-707.
327. Hori M., Kita M., Torihashi S., Miyamoto S., Won K.J., Sato K., Ozaki H., Karaki H.: Up regulation of iNOS by COX2 in muscularis resident macrophage rat intestine stimulated with LPS, *Am. J. Physiol.*, 2001, 280, G930-G938.
328. Horváth É.M.: Liver damage due to free radicals and its antioxidant prevention studies on liver regeneration and chemically induced hepatic porphyria, Ph.D. Tézisek, 2001.
329. Horváth É.M., Blázovics A., Fehér E., González-Cabello R., Vásárhelyi B., Barta I., Fehér J.: Free radicals and liver regeneration, In: *Oxygen free radicals and scavengers in the natural sciences*, ed.: by Mózsik Gy., Emerit I., Fehér J., Matkovics B., Vincze A.: Akadémiai Kiadó, Budapest, 1993, 301-304.
330. Horváth É.M., Blázovics A., Kemény T., Vásárhelyi B., Weinbrenner Zs., Fehér J.: E-vitamin antioxidáns hatásának tanulmányozása kísérletesen létrehozott hiperlipidémiában, *Orvosi Hetilap*, 1993a, 134, 1757-1760.
331. Horváth É.M., Faux S.P., Blázovics A., Fehér J., Cheeseman K.H.: Lipid and DNA oxidative damage in experimentally induced hepatic porphyria in C57BL/10SeSn mice, *Z. Gastroenterology.*, 2001a, 39, 453-458,
332. Horváth É.M., Faux S.P., Smith A.G., Blázovics A., Van der Looij M., Fehér J., Cheeseman K.H.: Vitamin E protects against iron-hexachlorobenzene induced porphyria and formation of 8-hydroxy-deoxy guanoside in the liver of C57BL/10SeSa mice, *Toxicology Lett.*, 2001b, 122, 1, 97-102.
333. Horváth É.M., Gonzalez-Cabello R., Blázovics A., van der Looij M., Barta I., Múzes Gy., Gergely P., Fehér J.: Effect of silibinin and Vitamin E on restoration of cellular immune response after partial hepatectomy, *J. Ethnopharmacol.*, 2001c, 77, 2-3, 227-232.
334. Horváth T., Blázovics A.: Chemiluminescence in blood sysgtem of alcoholics and of patients with subliminal alcohol-drug use, *Croat. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1992, 1, 159-163.
335. Horváth T., Blázovics A., Szabó L., Past T., Hoffmann-Traeger A.: The role of subliminal interactions in hepatotoxicity: chronic alcohol abuse, micronutrients and drugs, *Liver diseases, hepatitis*, 4th Word Congress International Gastro-Surgical Club, Proceedings, 1994, 539-543.
336. Horváth T., Szabó L., Nagy Z., Blázovics A., Gergely K., Schwartz T.: Endogenous scavenger levels (vitamin E and A) of patients with chronic alcoholic liver disease under different environmental conditions, *Acta Phys. Hung.*, 1992a, 80, 381-389.
337. Horváth T., Szabó L., Past T., Blázovics A., Horváth A., Nagy Zs., Bittó J., Mézes M.: Környezeti tényezők hatása az oxidatív stressz lefolyására és védő mechanizmusaira idült alkoholos májbetegségekben, *Hévízi Könyvtár, Karsztvízvédelem a Közép-Dunántúlon, Hévíz*, 1994-(2000)a, 102-117.

338. Hu Y., Oscarson M., Johansson I., Yue Q.Y., Dahl M.I., Tabone M., Arinco S., Albano E., Ingelman-Sundberg M.: Genetic polymorphism of human CYP 2E1: characterization of two variant alleles, *Mol. Pharmacol.*, 1997, 51, 370-376.
339. Huang, M.T. Ferraro T.: Phenolic compounds in food and cancer prevention, In: Huang M.T. Ho C., Lee C.Y. eds., *Phenolic compounds in food and their effects on health, II. ACS Symposium Series.*, New York, 1992, 507, 8-34.
340. Hughes F.J., Buttery L.D.K., Hukkanen M.V.J., O'Donnel A., Macclouf J., Polak J.M.: Cytokine-induced prostaglandin E2 synthesis and cyclooxygenase-2 activity are regulated both by nitric oxide-dependent and -independent mechanism in rat osteoblasts in vitro, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 1776-1782.
341. Hudson B.J.F., Lewis J.I.: Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Structural criteria for activity, *Food Chem.*, 1983, 10, 47-55.
342. Hui D.Y., Harmony J.A.K.: Inhibition by low density lipoproteins of mitogen stimulated cyclic nucleotide production by lymphocytes, *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 1413-1429.
343. Hungarian Pharmacopoeia (Ph. Hg. VII.), Medicina Press, Budapest, 1992.
344. Ignarro I.J.: Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1990, 30, 535-560.
345. Ingelman-Sundberg M., Johansson I., Yin H., Terelius Y., Eliasson E., Clot P., Albano E.: Ethanol-inducible cytochrome P4502E1: genetic polymorphism, regulation and possible role in the etiology of alcohol-induced liver disease, *Alcohol*, 1993, 10, 447-452.
346. Isfaoun A., Bureau F., Mouly-Boudey M., Drosdowsky M., Arhan P., Bougle D.: Relationships between iron and zinc metabolism: Predictive value of digestive absorption on tissue storage, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 1997, 11, 23-27.
347. Ishii N., Tsuzuki Y., Matsuzaki K., Miyazaki J., Okada Y., Hokari R., Kawaguchi A., Nagao S., Itoh K., Miura S.: Endotoxin stimulates monocyte-endothelial cell interactions in mouse intestinal Peyer's patches and villus mucosa, *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, 135, 226-232.
348. Iqbal N., Oliver J.R., Wagner F.H., Lazenby A.S., Elson C.O., Weaver C.T.: T helper 1 and T helper 2 cells are pathogenic in an antigen-specific model of colitis, *J. Exp. Med.*, 2002, 195, 71-84.
349. Itoh S., Yougel T., Kavagoe K.: Comparison between nonalcoholic steatohepatitis and alcoholic hepatitis, *Am. J. Gastroenterol.*, 1987, 82, 650-654.
350. Iwasaki K., Noguchi K., Endo H., Kondo H., Ishikawa I.: Prostaglandin E2 downregulates interleukin-12 production through EP4 receptors in human monocytes stimulated with lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetis comitans* and interferon-gamma, *Oral Microbiol. Immunol.*, 2003, 18, 3, 150-155.
351. Jacobson S., Plantin L.O.: Concentration of selenium in plasma and erythrocytes during total parenteral nutrition in Cron's disease, *Gut*, 1985, 26, 50-54.
352. Jadoul M., De Plaen J.F., Cosyns J.P., van Ypersele de Stribou C.: Adverse effects from traditional Chinese medicine, *Lancet*, 1993, 341, 892- 893.
353. Jakobey H., Habegger R., Fritz D.: Gemüse als Arzneipflanze. Secundäre pflanzenstoffe im Gemüse mit Bedeutung für die menschliche Gesundheit, 2. Mitteilung: Gemüse aus der Familie der Brassicaceae und der Familie der Apiaceae, *Ernährungs-Umschau.*, 1988, 35, 275-279.
354. Janick J.: History of Asian Horticulture, XXVI. International Horticultural Congress and Exhibition, IHC 2002, S11-0119, 322.
355. Jansson J., Schenkman J.B.: Studies on three microsomal electron transfer enzyme systems (Specificity of electron flow pathways), *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977, 178, 89-107.

356. Jobin C., Sartor R.B.: The I κ B/NK- κ B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection, *Am. J. Physiol.*, 2000, 278, C451-C462.
357. Jordan R.A., Schenkman J.B.: Relationship between malondialdehyde production and arachidonate consumption during NADPH-supported microsomal lipid peroxidation, *Biochem. Pharmacol.*, 1982, 31, 1393-1400.
358. Józefowski S., Bobek M., Marcinkiewicz J.: Exogenous but not endogenous prostanoids regulate cytokine secretion from murine bone marrow dendritic cells: EP2, DP2 and IP but not EP1, EP3 and FP prostanoid receptors are involved, *Int. Immunopharmacol.*, 2003, 3, 865-878.
359. Jozkowicz A., Dulak J., Prager M., Nanobashvili J., Nigisch A., Winter B., Weigel G., Huk I.: Prostaglandin-J2 induces synthesis of interleukin-8 by endothelial cells in a PPAR-gamma-independent manner, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 2001, 66, 165-177.
360. Kabata-Pendias A., Pendias H.: Trace elements in soil and plants, 2nd ed.: CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992.
361. Kalinski P., Schuitmaker J.H.N., Hilkens C.M., Kapsenberg M.L.: Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a⁺ CD83⁺ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation, *J. Immunol.*, 1998, 161, 2804-2809.
362. Kandaswami, C., Middleton, E.: Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1994, 366, 351-376.
363. Karafilov C.I., Liu B., Fox C.C., Lakshmanan R.R., Whisler R.L.: Age related defects in Th1 and Th2 cytokine production by human, Th2 cytokine production by T cell can be dissociated from altered frequencies of CD45RA⁺ and CD45RO⁺ T cell subsets, *Mech. Ageing. Dev.*, 1999, 109, 97-112.
364. Kasprzak K.S., Waalkes M.P., Poirier L.A.: Effect of essential divalent metals on carcinogenicity and metabolism of nickel and cadmium, *Biol. Trace. Elem. Res.*, 1987, 13, 253-273.
365. Katagiri S.: Experimental study on lipid metabolism after partial hepatectomy – with reference to mitochondrial function of the regenerating liver, *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 1988, 89, 694-702.
366. Kates M.: Techniques of lipidology isolation analysis and identification of lipids, (eds. Work T.S., Work E.: Nort Holland /American Elsevier) 1975.
367. Kato S., Kawase T., Alderman J., Inatomi N., Lieber C.S.: Role of xanthine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation in rats, *Gastroenterology*, 1990, 98, 203-210.
368. Kawakami M., Watanabe N., Ogawa H., Murase T., Yamada N., Sando H., Shibata S., Oda T, Takaku F.: Specificity in metabolic effects of cachectin/TNF and other related cytokines, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1990, 58, 339-350.
369. Kellis, J. T., Vickery, L. E.: Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones, *Science*, 1984, 225, 1032-1034.
370. Kemény, T., Weinbrenner, Zs., Jeranek M.: The biological role of polyunsaturated fatty acids, An analytical study, *Oil, Soap, Cosmetics*, 1990, 39, 72-80.
371. Kempná P., Zingg J.M., Ricciarely R., Hierl M., Saxena Z., Azzi A.: Cloning of novel human SEC14p-like proteins: cellular localization, ligand binding and functional properties, *Free Radic. Biol. Med.*, 2003, 34, 1458-1472.
372. Kernohan N.M., Hupp T.R., Lane D.P.: Modification of an N-terminal regulatory domain of T antigen restores P53-T antigen complex formation in the absence of an essential metal ion cofactor, *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 4954-4960.
373. Kéry A.: ESCOP – Európai harmonizáció a fitoterápiában, *Fitoterápia* 1995, 2, 59-61.

374. Kéry Á., Balázs A., Kursinszky L., Apáti P., Szőke É., Blázovics A., Hagymási K.: Radical scavenger and antioxidant activities of selected medicinal plants, *Proceedings of the International conference on Medicinal and Aromatic Plants, Part II.* eds. Szőke É., Máté I., Blunden G., Kéry Á., 2003, 177-184.
375. Kéry A., Blázovics A., Fejes Sz., Nagy É., Lugasi A., Kursinszky L., Czinner E., Kristó T.Sz., Apáti P., Balázs A., Szőke É.: Antioxidant activity of medicinal plants used in phytotherapy, *Int. J. Horticultural Science*, 2001, 7, 2, 28-35.
376. Kéry, Á. Blázovics A., Rozlosnik N., Fehér J., Petri G.: Antioxidative properties of extracts from *Sempervivum tectorum*, *Planta Medica*, 1992, 58, Suppl. 1, A661-A662.
377. Kett K., Rognum T.O., Brandtzaeg P.: Mucosal subclass distribution of immunoglobulin G-producing cells is different in ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon, *Gastroenterology*, 1987, 93, 919-924.
378. Kimura Y., Okuda H., Arichi S.: Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochem. Biophys. Acta*, 1985, 834, 275-278.
379. Kimura M., Yokoi K.: Iron accumulation in tissues of magnesium-deficient rats with dietary iron overload: Experimental hemochromatosis model, *Biol. Trace Elem. Res.*, 1996, 41, 177-198.
380. Kinsella J.E., Lokesh B., Broughton S., Whelan J.: Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview, *Nutrition*, 1990, 6, 24-44.
381. Kliewer S.A., Lenhard J.M., Willson T.M., Patel I., Morris D.C., Lehmann J.M.: A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation, *Cell.*, 1995, 1, 813-819.
382. Kocsis I.: A redox-homeosztázis vizsgálati lehetőségei, jelentősége állatkísérletes és humán tanulmányokban, Ph.D. Tézisek, Budapest, 2004.
383. Kocsis I., Blázovics A., Pallai Zs., Fehér J.: A szervezet redox-egyensúlyának vizsgálati módszerei, lehetséges szerepük a diagnosztikában, *Orvosi Hetilap*, 2004a, 145, 14, 761-767.
384. Kocsis I., Hagymási K., Kéry Á., Szőke É., Blázovics A.: Effect of chicory on pancreas status of rats in experimental hyperlipidemia, *Acta Biologica Szegediensis*, 2003, 47, 1-4, 143-146.
385. Kocsis I., Lugasi A., Hagymási K., Kéry A., Fehér J., Szőke É., Blázovics A.: Beneficial properties of black radish root (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) squeezed juice in hyperlipidemic rats, biochemical and chemiluminescence measurements, *Acta Alim. Hung.*, 2002, 32, 1, 185-190.
386. Kocsis I., Pallai Zs., Fehér J., Blázovics A.: Az oxidatív károsodás monitorozásának lehetőségei, és a vizsgálatok klinikai vonatkozásai, *Orvosi Hetilap*, 2003a, 144, 47, 2315-2319.
387. Kocsis I., Szentmihályi K., Rapavi E., Hubay M., Kéry Á., Stefanovits-Bányai É., Szőke É. Blázovics A.: Effect of *Cichorium intibus* (L.) on the redox balance and metal ion content of fatty liver in hyperlipidemic rats. *Trace Elements and Electrolytes*, 2004, 21, 4, 262-268.
388. Koivisto T., Mishin V.M., Mak K.M., Cohen P.A., Lieber C.S.: Induction of cytochrome P-450-2E1 by ethanol in rat Kupffer cells, *Alcoholism Clin Exp. Res.*, 1996, 20, 207-212.
389. Kollmorgen G.M., Sansing W.A., Lehmann A.A., Fisher G., Longley R.E., Alexander S.S.fr., King M.M., McCay P.B.: Inhibition of lymphocyte function in rats fed higher-fat diets, *Cancer Res.*, 1979, 38, 3458-3462.
390. Kong, A.N.T., Yu, R., Lei, W., Mandlekar, S., Tan, T.H., Ucker, D.S.: Differential activation of MAPK and ICE/Ced3 protease in chemical-induced apoptosis: The role of oxidative stress in the regulation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) leading to gene expression and survival or activation of caspases leading to apoptosis, *Restor. Neurol. Neurosci.*, 1998, 12, 63-70.
391. Kopper L., Fésüs L.: Apoptosis, *Medicina*, Budapest, 2002.

392. Kovács Á.: Az infliximab (Remicade) helye a Crohn betegség gyógyszeres kezelésében, *Gyógyszereink*, 2003, 53, 53-56.
393. Kovács Á., Lugasi A., Blázovics A.: The beneficial effect of a natural antioxidant (Raphacol) in the therapy of IBD, *Inflammatory Bowel Disease a Clinical Case Approach to Pathophysiology, Diagnosis and Treatment*, Bologna, 2001, 06, 22-23.
394. Kruis W., Bar-Meir S., Fehér J., Mickisch, O., Mlitz, H., Faszczyk, M., Chowers, Y., Lengyel, G., Kovács, A., Lakatos, L., Stolte, M., Vieth, M., Greinwald, R.: The optimal dose of 5-aminosalicylic acid in acute ulcerative colitis: A dose-finding study with newly developed mesalamine, *Clin. Gastroent. Hepatol.*, 2003, 1, 37-43.
395. Kudrin A.V.: Trace elements in regulation of NF- κ B activity, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2000, 14, 129-142.
396. Kuhlenskamp J., Ronk M., Yusin M., Stolz A., Kaplowitz N.: Identification and purification of a human liver cytosolic tocopherol binding protein, *Protein Expression Purit.*, 1993, 4, 382-389.
397. Kukurenda T., Lipski R.: Solubility of manganese in different soils and its availability to plants, *Pamiet, Pulawski*, 1982, 76, 172.
398. Kunitoh S., Imaoka S., Hiroi T., Yabusaki Y., Monna T., Funae Y.: Acetaldehyde as well as ethanol is metabolized by human CYP2E1, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1997, 280, 527-532.
399. Kuo-Hom L., Vithal H.S., Ghanta V., Raymond K., Hiramto N.: Immunosuppressive effect of mouse serum lipoproteins, I. In vivo studies. *J. Immunol.*, 1981, 126, 1909-1913.
400. Kuppusamy, U. R., Khoo, H. E., Das, N. P.: Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase, *Biochem. Pharmacol.*, 1990, 40, 397-401.
401. Kühnau J.: The flavonoids: a class of semi essential food components: Their role in human nutrition, *World Rev. Nutr. Diet.*, 1976, 24, 117-120.
402. Lacka B., Grzeszczal W., Strojek K., Twardowska S.K.: Lipid peroxidation, antioxidant enzyme activity, and trace element concentration in primarily hypertension, *Trace Elem. Electrol.*, 1997, 14, 61-65.
403. LaMont J.T., Turner B.S., DiBenedetto D., Hardin R., Schafer A.I.: Arachidonic acid stimulates mucin secretion in prairie dog gallbladder, *Am. J. Physiol.*, 1983, 245, G92-G98.
404. LaMorte W.W., LaMont J.T., Hale W., Booker M.L., Scott T.E., Turner B.: Gallbladder prostaglandin and lysophospholipids as mediators of mucin secretion during cholelithiasis, *Am. J. Physiol.*, 1986, 251, 701-709.
405. Lakatos B., Szentmihályi K., Vinkler P., Balla Gy., Balla J.: A vas fiziológiás és patológiás szerepe az emberi szervezet működésében, *Az újszülöttek vashiányos anémiája*, *Orvosi Hetilap* 2004, 145, 36, 1853-1859.
406. Lander H.M., Ogiste J.S., Teng, K.K., Novogrodsky A.: p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress, *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 21195- 21198.
407. Lange D.: Production, trade, and ecological management of medicinal and aromatic plants, XXVI. International Horticultural Congress and Exhibition, IHC 2002, S06-035, 186.
408. Laposata E.A., Lange L.G.: Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse, *Science*, 1986, 23, 497-499.
409. Loughton M.J., Halliwell B., Evans P.J., Hoult J.R.: Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossipol and myricetin, Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin dependent damage to DNA, *Biochem. Pharmacol.*, 1989, 38, 2859-2865.

410. Lazzeri L.: Exploitation of the Myrosinase-Glucosinolate System, *J. Agric. Food Chem.*, 1993, 41, 825-829.
411. Lebovics V.K., Antal M., Gaál Ö.: Enzymatic determination of cholesterol oxides, *J. Sci. Agric.*, 1996, 71, 22-26.
412. Lee S.P.: Hypersecretion of mucus glycoprotein by the gallbladder epithelium in experimental cholelithiasis, *Pathology.*, 1981, 134, 199-207.
413. Lee S.P., Carrey M.C., LaMont J.T.: Aspirin prevention of cholesterol gallstone formation in prairie dog, *Science*, 1981a, 211, 1429-1431.
414. Lee S.P., LaMont J.T., Carrey M.C.: Role of gallbladder mucus hypersecretion in the evolution of cholesterol gallstones: studies in the prairie dog, *J. Clin. Invest.*, 1981b, 67, 1712-1723.
415. Lee S.P., Nicholls J.F.: Nature and composition of biliary sludge, *Gastroenterology*, 1986, 90, 677-686.
416. Lehmann J.M., Lenhard J.M., Oliver B.B., Ringold G.M., Kliever S.A.: Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal and anti-inflammatory drugs, *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 3406-3410.
417. Leid M., Kastner P., Chambon P.: Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways, *Trends Biochem. Sci.*, 1992, 17, 427-433.
418. Lelbach Á., Lugasi A., Blázovics A., Fehér E., Fehér J.: Species függő antioxidáns védelem emlősök jejunumában, *Magyar Belgyógyász Társaság 36. Nagygyűlése*, Budapest, 1996.
419. Leo M.A., Rosman A.S., Lieber C.S.: Differential depletion of carotenoids and tocopherol in liver disease, *Hepatology*, 1993, 17, 977-986.
420. Leung A.Y., Foster S.: *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics*, 2nd. ed.: New York, John Wiley & Sons, 1996, 50-53.
421. Levy P.F., Smith B.F., LaMont J.T.: Human gallbladder mucin accelerates nucleation of cholesterol in artificial bile, *Gastroenterology*, 1984, 87, 270-275.
422. Lewis K.O., Paton A.: Could superoxide cause cirrhosis? *Lancet* ii., 1992, 188-189.
423. Li Y.F., Moody F.G., Weisbrodt N.W., Zalewsky C.A., Coelho C.V., Senninger N., Gouma D.: Gallbladder contractility and mucus secretion after cholesterol feeding in the prairie dog, *Surgery*, 1986, 100, 900-904.
424. Liao C.S., Lin J.S., Chang C.P., Chao T.J., Chao Y.C., Cheng T.C., Wu C.W., Yin S.J.: Stomach and duodenal alcohol and aldehyde dehydrogenase isozymes in Chinese, *Proc. Natl. Sci.*, 1991, 15, 92-96.
425. Lieber C.S. ed.: Metabolism of ethanol. In: *Metabolic aspects of alcoholism*, Baltimore. Maryland: University Park Press, 1977, 1-29.
426. Lieber C. S.: Ethanol metabolism, cirrhosis, and alcoholism, *Clin. Chim. Acta*, 1997, 257, 59-84.
427. Lieber C.S.: Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases, *Adv. Pharmacol.*, 1997a, 38, 601-628.
428. Lieber C.S.: Interaction of alcohol with other drugs and nutrients. Implication for the therapy of alcoholic liver disease, *Drugs*, 1990, 40, 23-44.
429. Liebler D.C., Baker P.F., Kaysen K.L.: Oxidation of vitamin E: Evidence for competing autoxidation and peroxy radical trapping reactions of the tocopheroxyl radical, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 6995-7000.
430. Lieber C.S., DeCarli L.M., Feinman L., Hasumura Y., Korsten M., Matsuzaki S., Teschke R.: Effect of chronic alcohol consumption on ethanol and acetaldehyde metabolism, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1975, 59, 185-227.

431. Lih-Brody L., Powell S.R., Collier K.P., Reddy G.M., Cerchia R., Kahn E., Weissman G.S., Katz S., Floyd R.A., McKinley M.J., Fisher S.E., Mullin G.: Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease, *Dig. Dis. Sci.*, 1996, 41, 2078-2086.
432. Lindor K.D., Kowdley K.V., Heathcote E.J., Harrison M.E., Jorgensen R., Angulo P., Lymp J.F., Burgart L., Colin P.: Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial, *Hepatology*, 2004, 39, 770-778.
433. Liu C.S., Song Y.S., Zhang K.J., Ryu J.C., Kim M., Zhou T.H.: Gas chromatographic/mass spectrometric profiling of luteolin and its metabolites in rat urine and bile, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1995, 13, 1409-1414.
434. Liu, J., Kershaw, W.C., Klaassen, C.D.: The protective effect of metallothionein on the toxicity of various metals in rat primary hepatocyte culture, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1991, 107, 27-34.
435. Liu L., Wells P.G.: Phenytoin-induced lipid peroxidation and protein degradation catalyzed by prostaglandin H synthase in murine hepatic microsomes, *Proc. Can. Fed. Biol. Soc.*, 1992, 35, 101.
436. Lo D., Tynan W., Dickerson J., Scharf M., Cooper J., Byrne D., Brayden D., Higgins L., Evans C., O'Mahony D.J.: Cell culture modeling of specialized tissue: identification of genes expressed specifically by follicle-associated epithelium of Peyer's patch by expression profiling of Caco-2/Raji co-cultures, *Int. Immunol.*, 2004, 16, 91-99.
437. Loeschke K., Ueberschaer B., Pietsch A., Gruber E., Ewe K., Wiebecke B., Heldwein W., Lorenz R.: n-3 fatty acids only delay early relapse of ulcerative colitis in remission, *Dig. Dis. Sci.*, 1996, 41, 2087-2093.
438. Lorenz R., Weber P.C., Szimnau P., Heldwein W., Strasser T., Loeschke K.: Supplementation with n-3 fatty acids from fish oil in chronic inflammatory bowel disease – a randomized, placebo-controlled, double-blind cross-over trial, *J. Intern. Med.*, 1989, 225, 225-232.
439. Lowry A.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagents, *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265-275.
440. Luckner, M.: Secondary metabolism in plants and animals, Chapman & Hall, London, 1972.
441. Ludwig J., Viggiano T.R., McGill DB., Oh B.J.: Nonalcoholic steatohepatitis, *Mayo Clin. Proc.*, 1980, 55, 534-538.
442. Lugasi A.: Az élelmiszer eredetű flavonoidok potenciális egészségvédő hatása, *Orvosi Hetilap*, 2000, 141, 32, 1751-1761.
443. Lugasi A.: Élelmiszer eredetű antioxidánsok hatása a primer és szekunder prevencióban: állatkísérletes és humán tanulmányok, Ph.D. Tézisek, Budapest, 2001.
444. Lugasi A., Blázovics A.: Az egészséges táplálkozás tudományos alapjai, 4. számú útmutató az egészség megőrzéséhez, PXP Nyomda, Budapest, 2004.
445. Lugasi A., Blázovics A., Dworschák E., Fehér J.: A vörösbor kardioprotektív hatásáról az irodalmi adatok tükrében, *Orv. Hetil.* 1997, 138, 673-681.
446. Lugasi A., Blázovics A., Fehér J.: Magyar vörösborok in vitro antioxidáns tulajdonságai, *Orv. Hetil.*, 1999, 140, 2051-2056.
447. Lugasi A., Blázovics A., Kéry Á., Horváth T., Kassai-Farkas S.: A feketeteretek-hatóanyagú Raphacol epegranulátum hatása a cukorbetegség lipidperoxidációs paramétereire, *Fitoterápia*, 2001a, 6, 1, 12-19.
448. Lugasi A., Blázovics A., Kéry Á., Kocsis I., Kassai-Farkas S., Horváth T.: A feketeteretek-hatóanyagú Raphacol epegranulátum hatása cukorbetegség szérumban paramétereire, *Fitoterápia*, 2001b, 5, 3-4, 72-78.

449. Lugasi A., Blázovics A., Lebovics V.K., Kocsis I., Kéry Á.: Beneficial health effect of black radish and in vivo experimental conditions, *Phytochemistry and Pharmacology* Vol.2. pp. 365-375 2002. SCI TECH Publishing LLC, Texas, USA
450. Lugasi A., Dworschák E., Blázovics A., Kéry Á.: Antioxidant and free radical scavenging properties of squeezed juice from black radish (*Raphanus sativus* L. Var. *niger*) root, *Phytotherapy Res.*, 1998, 12, 502-506.
451. Lügering A., Schmidt M., Lügering N., Pauels H.G., Domschke W., Kucharzik T.: Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase – dependent pathway, *Gastroenterology*, 2001, 121, 1145-1157.
452. Lunec J., Holloway K.A., Cooke M.S., Faux S., Griffiths H.R., Evans M.D.: Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: Redox regulation of DNA repair in vivo, *Free Rad. Biol. Med.*, 2002, 33, 7, 875-885.
453. MacDonald T.T., Murch S.H.: Aetiology and pathogenesis of chronic inflammatory bowel disease, *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 1994, 8, 1-34.
454. MacGregor J.T., Jurd L.: Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*, *Mutat. Res.*, 1978, 54, 297-309.
455. Máday E., Szentmihályi K., Then M., Szőke É.: Mineral element content of chamomile, *Acta Aliment. Hung.*, 2000, 29, 51-57.
456. Mahida Y.R., Ceska M., Effenberger F., Kurlak L., Lindley I., Hawkey C.J.: Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in active ulcerative colitis, *Clin. Sci. (Lond)*, 1992, 82, 273-275.
457. VII. Magyar Gyógyszerkönyv, *Pharmacopoea Hungarica Editio VII. (Ph.Hg. VII.) Medicina*, Budapest. 1992.
458. Magyar Közlöny Az állatok védelméről és kíméléséről” c. 1998. évi XXVIII. Törvény, 28. 2407. 2414,
459. Malaguarnea L., Ferlito L., Imbesi R.M., Gulizia G.S., Di Mauro S., Maugeri D., Malaguarnea M., Messina A.: Immunosenescence: a review, *Arch. Gerontol. Geriat.*, 2001, 32, 1-4
460. Manach C., Morand C., Demigné C., Demigne C., Texier O.: Bioavailability of rutin and quercetin in rats, *FEBS Letter*, 1997. 409. 12-16.
461. Manach C., Regerat F., Texier O., Agullo G.: Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids, *Nutr. Res.*, 1996, 16, 517-544.
462. Mano H., Mori R., Ozawa T., Takeyama K., Yosizawa Y., Kojima R., Arao Y.: Positive and negative regulation of retinoid X receptor gene expression by thyroid hormone in the rat, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 1591-1594.
463. Maret W.: Zinc biochemistry, physiology and homeostasis – recent insights and current trends. *BioMetals*, 2001, 14, 187-190.
464. Marubayashi S., Oku J., Dohi K., Ochi K., Yamada K., Kawasaki T.: Changes in the levels of lipid peroxides in regenerating rat liver and the effect of pretreatment with CoQ10, *Nippon Gekka Gakkai Zasshi*, 1988, 89, 381-387.
465. Matsuo M., Matsumoto S., Iitaka Y., Niki E.: Radical scavenging reactions of vitamin E and its model compound, 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-chromanol, in a tert-butylperoxyl radical-generating system, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 71, 7179-7185.
466. May J.M., Qu Z.C., Whitesell R.R., Cobb C.E.: Ascorbate recycling in human erythrocytes: Role of GSH in reducing dehydroascorbate, *Free Rad. Biol. Med.*, 1996, 20, 543-551.
467. McCay P.B.: Vitamin E: Interactions with free radicals and ascorbate, *Ann. Rev. Nutr.*, 1985, 5, 323-340.

468. McCord J.M.: The evolution of free radicals and oxidative stress, *Am. J. Med.*, 2000, 108, 652.
469. McCord J.M., Fridovich I.: Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein), *J. Biol. Chem.* 1969, 244, 6049-6055.
470. McKenzie S.J., Baker M.S., Buffinton G.D., Doe W.F.: Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease, *J. Clin. Invest.*, 1996, 98, 136-141.
471. Meade E.A., McIntyre T.M., Zimmerman G.A., Prescott S.M.: Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells, *J. Biol. Chem.*, 1999, 19, 8328-8334.
472. Mengel K.: A növények táplálkozása és anyagsrége, *Mezőgazdasági Kiadó*, Budapest, 1976, 1-365.
473. Mercer J.F.B., Stevenson T., Wake S.A., Mitropoulos G., Camakaris J., Danks D.M.: Developmental variation in copper, zinc and metallothionein mRNA in brindled mutant and nutritionally copper deficient mice, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 1991, 1097, 205-211.
474. Meydani S.N., Endres S., Woods M.M., Goldin B.R., Soo C., Morrill-Labrode A., Dinarello C.A., Gorbach S.L.: Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: Comparison between young and old women. *J. Nutr.*, 1991, 121, 547-555.
475. Meyer U.A.: Overview of enzymes of drug metabolism, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 1996, 24, 449-459.
476. Meyer M., Schreck R., Baeuerle P.A.: H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant responsive factor, *EMBO J.*, 1993, 12, 2005-2015.
477. Meydani S.N.: Effect of (n-3) polyunsaturated fatty acids on cytokine production and their biologic function, *Suppl. Nutrition*, 1996, 12, 1, S8-S14.
478. Middleton S.J., Naylor S., Woolner J., Hunter J.O.: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of essential fatty acid supplementation in the maintenance of remission of ulcerative colitis, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2002, 16, 1131-1135.
479. Miller G., Quanchenbush F.: A comparison of alkylated phenols as antioxidants for lard. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1957, 3, 249-250.
480. Mizoi Y., Yamamoto K., Ueno Y., Fukunaga T., Harada S.: Involvement of genetic polymorphysm of alcohol and aldehyde dehydrogenases in individual variation of alcohol metabolism, *Alc. Alcohol*, 1994, 29, 707-710.
481. Mizuno T., Kato N., Totsuka A., Takenaka K., Shinkai K., Shimizu M.: Frakcionation, structural features and antitumor activity of water-soluble polysaccharide from „Reishi”, the fruit body of *Ganoderma lucidum*, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1984, 58, 871-880.
482. Mizuno T., Susuki E., Maki K., Tamaki H.: Fraktionation, chemical modification and antitumor activity of water-insoluble polysaccharides of the fruiting body of *Ganoderma lucidu.*, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1985, 1143-1151.
483. Mole S., Rogler J.C., Buler L.G.: Use of 15N labeled protein to determine the effect of dietary tannin on the relative abundance of endogenous and dietary protein in feces, *Proc. Group Polyphenols*, XVth. Int. Conf 1990.
484. Molnár P., Oláh P., Deli J., Tóth Gy., Szabó LGy., Pfander H.: Kínai és magyar származású *Lycium barbarum* L. termésének karotinoid-összetétele, *Gyógynövények kutatása és felhasználása*, Kecskemét, 2002, 10. Magyar Gyógynövény Konferencia.
485. Morand C., Crespy V., Manach C., Besson C.: Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties, *Am. J. Phys.*, 1998, 275, R212-R219.
486. Morel Y., Barouki R.: Repression of gene expression by oxidative stress, *Biochem. J.*, 1999, 342, 481-496.

487. Moriguchi S., Miwa H., Okamura M., Maekawa K., Kishino Y., Maeda K.: Vitamin E is an important factor in T cell differentiation in thymus of F344 rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1993, 39, 451-463.
488. Morse J.H., Whitte L.D., Goodman D.S.: Inhibition of lymphocyte proliferation stimulated by lectins an allogenic cell by normal plasma lipoproteins, *J. Exp. Med.*, 1977, 146, 1791-1803.
489. Mózsik G., Bodis B., Figler M., Király A., Karádi O., Par A., Rumi G., Sütő G., Tóth G, Vincze A.: Mechanisms of action of retinoids in gastrointestinal mucosal protection in animals, human healthy subjects and patients, *Life Sci.*, 2001, 69, 3103-3112.
490. Mraca M., Blanckaert N.: *Clin. Chem.*, 1983, 29, 1767.
491. Mulder T.P., van der Sluys Veer A., Verspaget H.W. Griffioen G., Pena A.S., Janssens A.R., Lamers C.B.: Effect of oral zink supplementation on metallothionein and superoxide dismutase concentrations in patients with inflammatory bowel disease, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1994, 9, 472-477.
492. Murhbeck O., Ahlberg J.: Prevalence of gallstone disease in a Swedish population, *Scand. J. Gastroenterol.*, 1995, 30, 1125-1128.
493. Müzes, Gy. Deák, Gy., Láng, I., Gonzalez-Cabello, R., Gergely, P., Fehér, J.: Depressed monocytes production of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α in patients with alcoholic liver cirrhosis, *Liver*, 1989, 9, 5, 302-306.
494. Müzes, Gy., Vien, C.V., González-Cabello, R., Gergely, P., Fehér, J.: A simple assay for tumor necrosis factor using Hep-2 target cells, *J. Clin. Lab. Immunol.*, 1989a, 30, 1, 41-44.
495. Nakao T., Tabata M., Nakayama F.: Unconjugated bilirubin in hepatic bile with brown pigment gallstone and cholangitis, *Dig. Dis. Sci.*, 1988,33, 1116-1120.
496. Narumiya S., Fukushima M.: Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. I. Active transport and intracellular accumulation of cyclopentenone prostaglandins, a reaction leading to growth inhibition, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1986, 239, 500-505.
497. Nechifor M., Chelarescu D., Miftode M., Palamaru I.: Investigation concerning manganese influence on morphine-induced pharmaco dependence in rat, *Mikroelemek a táplálékláncban*, Szerk. Simon L., Szilágyi M. 2003, 443-451.
498. Nelson N. A., Kelly R.C., Johnson R.A.: Upjohn Co.: Prostaglandins and the arachidonic acid cascade, Special Report., C and EN, 1982.
499. Nemetz A., Tóth M., Garcia-Gonzalez M.A., Zágoni T., Fehér J., Peña A.S., Tulassay Z: Allelic variation at the interleukin 1b gene is associated with decreased bone mass in patients with inflammatory bowel diseases, *Gut*, 2001, 49, 644-649.
500. Nemirovski L.E., Vasiljev V.K.: Effect of the level of free-radical lipid peroxidation on the ribonukleotide reductase activity of liver tissue, *Biokhimiia*, 1987, 52, 1614-1617.
501. Neutra M.R., Kraehenbuhl J.P.: Transepithelial transport and mucosal defence I: the role of M cells, *Trends Cell Biol.*, 1992, 2, 5, 134-138.
502. Nielsen, S.E., Breiholt, V., Justesen, U. Cornett C., Dragsted L.O.: In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes, *Xenobiotica*, 1998, 28, 389-401.
503. Nielsen O.H., Rask-Madsen J.: Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease, *Scand. J. Gastroent. Suppl.*, 1996, 216, 149-159.
504. Niki E., Tsuchiya J., Tanimura R., Kamiya Y.: Regeneration of vitamin E from alpha-chromanoxyl radical by GSH and vitamin C, *Chem. Lett.*, 1982, 789-792.
505. Noguchi K., Iwasaki K., Shitashige M., Umeda M., Izumi Y., Murota S., Ishikawa I.: Downregulation of lipopolysaccharide-induced intercellular adhesion molecule-1 expression via EP2/EP4 receptors by prostaglandin E2 in human fibroblasts, *Inflammation*. 2001, 25, 2, 75-81.

506. Nordmann R, Rouach H.: Alcohol and free radicals: from basic research to clinical prospects, *Ann Gastroent Hepatol Paris*, 1996, 32, 128-133.
507. Normen L., Johnsson M., Andersson H., van Gameren Y., Dutta P.: Plant sterols in vegetables and fruits commonly consumed in Sweden, *Eur. J. Nutr.*, 1999, 38, 84-89.
508. Official Newsletter of ESCOP 1989, 1994,
509. Ohlsson B.G., Englund M.C., Karlsson A.L., Knutsen E., Erixon C., Skribeck H, Liu Y, Bondjers G., Wiklund O.: Oxidized low density lipoprotein inhibits lipopolysaccharide-induced binding of nuclear factor-kappaB to DNA and the subsequent expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in macrophages, *J. Clin. Invest.*, 1996, 1, 78-89.
510. Okuda T., Yoshida T., Hatano T.: Hydrolyzable tannins and related polyphenols. In: W. Herz (ed). *Progress in the chemistry of natural organic products*, Springer-Verlag, Wien, N.Y., 66, 1-117, 1995.
511. Okuda T., Yoshida T., Hatano T.: Chemistry and biological activity of tannins in medicinal plants. In: Wagner H. and Farnsworth N. R. (eds.) *Economic and medicinal plant research*, 1991, 129-165.
512. Okujama Y., Shinzawa H., Ukai K., Ono K., Togashi H., Wakabayashi H., Yamada N., Nakamura T., Takahashi T., Ishikawa M.: Changes of Cu, Zn-SOD and LPO in the regenerating liver after partial hepatectomy – effect of coenzyme Q10 administration, *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. 1991, 88, 1208-1205.
513. Okta T., Nagakawa T., Tsukioka Y., Sanada H., Miyazaki I., Terada T.: Proliferative activity of bile duct epithelium after bacterial infection in dogs, *Scand. J. Gastroenterol.*, 1992, 27, 845-851.
514. Old L.J.: Tumor necrosis factor (TNF), *Science*, 1985, 230, 630-632.
515. Omenn G.S., Goodman G.E., Thornquist M., Balmers J., Cullen M.R., Glass A., Keogh J.P., Meyskens F.L.Jr. et al.: The beta carotene and retinol efficacy trial (CARET) for chemoprevention of lung cancer in high risk populations: smokers and asbestos-exposed workers, *Cancer Res.* 1994, 54, 2038s-2043s.
516. Omura T., Sato R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 2370-2378.
517. Omura T., Sato R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 1964a, 239, 2379-2385.
518. Ottolenghi A.: Interaction of ascorbic acid on mitochondrial lipides, *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, 79, 355-363.
519. Owen R.W., Giacosa A., Hull W.E., Haubner R., Spiegelhalter B., Bartsch H.: The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil, *Eur. J. Cancer.*, 2000, 36, 1235-1247.
520. Oyaizu M.: Studies on products of browning reaction prepared from glucosamine, *Jpn. J. Nutr.*, 1986, 44, 307-315.
521. Pabst O., Ohl L., Wendland M., Wurbel M.A., Kremmer E., Malissen B., Forster R.: Chemokine receptor CCR9 contributes to the localization of plasma cells to the small intestine, *J. Exp. Med.*, 2004, 2, 411-416.
522. Pace-Asciak C. R., Asotra S.: Biosynthesis, catabolism, and biological properties of HPETEs, hydroperoxide derivatives of arachidonic acid, *Free Rad. Biol. Med.*, 1989, 7, 409-433.
523. Packer L., Rimbach G., Virgili F.: Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol, *Free Rad. Biol. Med.*, 1999, 27, 5/6, 704-724.
524. Packer J.E., Slater T.F., Wilson R.I.: Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C, *Nature*, 1979, 278, 737-742.

525. Pahlow M.: In Heilpflanze heute, Grafe und Unzer GmbH, Munchen, 1989, 249.
526. Pais I.: A mikrotápanyagok szerepe a mezőgazdaságban, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1980, 1-138.
527. Pais I.: A mikroelemek jelentősége a mezőgazdasági termelésben, kutatásuk helyzete a világban, Kertészeti Egyetem, Budapest, 1984.
528. Palozza P., Calviello G., Bartoli G.M.: Prooxidant activity of beta-carotene under 100% oxygen pressure in rat liver microsomes, *Free Rad. biol. Med.*, 1995, 19, 887-892..
529. PantsarKallio M., Manninen P.K.G.: Speciation of mobile arsenic in soil samples as a function of pH, *Sci. Total Environ.*, 1997, 204, 193-200.
530. Paolini M., Antelli A., Pozetti L., Spetlova D., Perocco P., Valgimigli L., Pedulli G.F., Cantelli-Forti G. Induction of cytochrome P450 enzymes and over generation of oxygen redicals in beta-carotene supplemented rats, *Carcinogenesis*, 2001, 22, 1483-1495.
531. Paolini M., Cantelli-Forti G., Perocco P.: Pedulli G.F., Abdel-Rahman S.Z., Legator M.S.: Cocarcinogenic effect of beta-carotene, *Nature*, 1999, 398, 760-761.
532. Paolini M., Pozetti L., Pedulli G.F.: The nature of prooxidant activity of vitamin C. *Life Sci.*, 1999, 64, 273-278.
533. Pavlick K.P., Laroux F.S., Fuseler J. Wolf R.E., Gray L., Hoffman J., Grisham M.B.: Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease, *Free Rad. Biol. Med.*, 2002, 33, 311-322.
534. Penso, G.. *Index Plantarum Medicinalium*, OEMF, Milano, Italy, 1982, 872.
535. Perdue M.H., Kosecka U., Crowe S.: Antigen mediated effects on epithelial function. In: *Neuro - immuno – physiology of the gastrointestinal mucosa*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 664. (ed) Stead R.H. Perdue M., Cooke H., Powell D.W., Barrett K.E. 325-334. 1992.
536. Perkins-Veazie P., Collins J.K., Willey E., Edwards A., Clevidence B.: Watermelon: A rich source of the antioxidant lycopene, XXVI. International Horticultural Congress and Exhibition, (IHC 2002). S09-0183, pp. 366.
537. Perner A., Andersen L., Pedersen G. Rask-Madsen J.: Superoxide production and expression of NAD(P)H oxidases by transformed and primary human colonic epithelial cells, *Gut*, 2003, 52, 231-236.
538. Peterson K.: „Natural” Cancer prevention trial halted, *Science*, 1996, 271, 441.
539. Petkovich M.: Regulation of gene expression by vitamin A: The role of nuclear retinoic acid receptors, *Annu. Rev. Nutr.*, 1992, 12, 443-471.
540. Petkovich M., Brand N.J., Krust A., Chombon P.: A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors, *Nature.*, 1987, 330, 444-450.
541. Petri G.: *Fitoterápia az orvosi gyakorlatban*, Springer Orvosi Kiadó, Budapest, 1999.
542. Petri G., Nyirediné Mikita K., Nyiredi Sz.: *Gyógynövények korszerű terápiás alkalmazása*, Medicina Budapest, 1989.
543. Player T.J., Horton A.A.: Enzymic lipid peroxidation in the liver microsomal fraction of rat brain, *J. Neurochem.*, 1981, 37, 422-426.
544. Pohl H.A., Gascoyne P.R., Szent-Györgyi A.: Electron spin resonance absorption of tissue constituents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977, 74, 4, 1558-1560.

545. Polya G.M., Polya Z., Kweifio-Okai G.: Biochemical pharmacology of anti-inflammatory plant secondary metabolites, pp. 1-22. in *Recent Progress in Medicinal Plants 8*, eds. Sighn E., Govil J.N., Sighn V.K. SCI TECH Publishing, Houston, Texas, USA., 2002.
546. Potter J.D.: Cancer prevention: Epidemiology and experiment, *Cancer Lett.*, 1997, 114, 7-9.
547. Powis G., Gasdanska J.R., Baker A.: Redox signalling and the control of cell growth and death, *Adv. Pharmacol.*, 1997, 38, 329-358.
548. Prónai L., Blázovics A., Horváth É.M., Láng I. Fehér J.: Superoxide activity of dihydroquinoline type derivative (CH 402 and MTDQ-DA), *Free Rad. Res. Comms.*, 1993, 19. 5. 287-296.
549. Pyles I.A., Strejskal J., Eizing S.: Spectrophotometric measurement of plasma 2-thiobarbituric acid-reactive substances in the presence of hemoglobin and bilirubin interference, (4355) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1993, 4, 407-419.
550. Rabinovitch P.S., Dziadon S., Brentnall T.A, Emond M.J., Crispin D.A., Haggitt RC., Bronner M.P.: Pancolonial chromosomal instability precedes dysplasia and cancer in ulcerative colitis, *Cancer Res.*, 1999, 59, 5148-5153.
551. Ramachandiran S., Huang Q., Dong J., Lau S.S., Monks T.J.: Mitogen activated protein kinases contribute to reactive oxygen species-induced cell death in renal proximal tubule epithelial cells, *Chem. Res. Toxicol.*, 2002, 15, 1635-1642.
552. Rao D.N., Yang M.X., Lasker J.M., Cederbaum A.I.: 1-Hydroxyethyl radical formation during NADPH-and NADH-dependent oxidation of ethanol by human liver microsomes, *Mol. Pharmacol.*, 1996, 49, 814-821.
553. Rapavi E., Blázovics A., Fehér J.: A gyógynövények szerepe az ősi Kína gyógyászatában, *Orvosi Hetilap* 2000, 141, 38, 2093-2096.
554. Rapavi E., Blázovics A.: Kínai gyógynövénytudomány dióhéjban, *Fitoterápia* 2000a, 1, 2, 18-23.
555. Rapavi E., Stefanovits-Bányai É., Szentmihályi K., Lugasi A., Szecskó V., Sztéfanov A., Balázs A., Blázovics A.: Trace elements and antioxidant properties of Hungarian dried herbs, *New Results in the Trace Element Research*, ed.: I. Pais. Sz.I. University, Budapest, 2003, 210-220.
556. RDA: Recommended Dietary Allowances, 10th ed.: National Academy, Press N.W. Washington D.C., 1989.
557. Renaud, S., de Lorgeril, M.: Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease, *Lancet*, 1992, 339, 1523-1526.
558. Ricardo Da Silva J. M., Rigaud J., Cheynier V.: Procyanidin dimers and trimers from grape seeds, *Phytochemistry*, 1991, 30, 1259-1264.
559. Ricote M., Li A.C., Willson T.M, Kelly C.J., Glass C.K.: The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation, *Nature*, 1998, 391, 79-82.
560. Rhodes J.M., Campbell B.J.: Inflammation and colorectal cancer: IBD-associated and sporadic cancer compared, *Trends Mol. Med.*, 2002, 8, 10-16.
561. Rhodes J.M.: Lectins, colitis and colon cancer, *J. Royal Coll. Physicians*, 2000, 34, 191-196.
562. Robak, J., Gryglewski, R. J.: Flavonoids are scavengers of superoxide anions, *Biochem. Pharmacol.*, 1988, 37, 837-841.
563. Rocca B., Fitzgerald G.A.: Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response, *Int. Immunopharmacol.*, 2002, 2, 603-630.
564. Roebuch, K.A.: Oxidative stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kB, *Int. J. Mol. Med.*, 1999, 4, 223-230

565. Roginsky V.A., Stegmann H.B.: Ascorbil radical as natural indicator of oxidative stress: Quantitative regularities, *Free Rad. Biol. Med.*, 1994, 17, 93-103.
566. Rosa ASE., Heaney RK., Portas CAM., Fenwick, G.R: Changes in glucosinolate concentrations in Brassica crops. (*B. oleracea* and *B. napus*) throughout growingseason, *J. Sci. Food Agric.*, 1996, 71, 237-244.
567. Rose R.C., Bode A.M.: Comments on the glutathione-ascorbic acid redox couple, *Free Rad. Biol. Med.*, 1995, 18, 955-956.
568. Rosenzweig K.E., Youmell M.B., Price B.D.: DNA-dependent protein kinase participates in the radiation activation of NF- κ B, *Int. J. Rad. Onc. Biol. Physic.*, 1997, 39, Suppl. 1, 145.
569. Rossi A., Kapahi P., Natoli G., Takahashi T., Chen Y., Karin M., Santoro M.G.: Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase, *Nature*, 2000, 6, 103-108.
570. Rosztóczy I.: Cytokinek: rendszer a rendszerben? *Magyar Belorvosi Archivum*, 1993, 46, 22.
571. Roth H.P., Kirchgessner M.: Calmodulin, zinc and calcium concentration in tissues of zinc- and calcium-deficient rats, *J. Trace Elem. Electro. Health. Dis.*, 1998, 2, 73-78.
572. Rudy J.L., Ibarra F., Zeigler M. Howard J., Argyle C.: Simutaneous determination of retinol, retinyl palmitate, and α -tocopherol in serum or plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography, *LG-GC International*, 1989, 3, 36-38.
573. Russel R.M.: The ageing process as a modifier of metabolism, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, 72S, 529S-532S.
574. Rust C., Gores G.: Apoptosis and liver diseases, *Am. J. Med.*, 2000, 108, 567-574.
575. Rusznyák St., Szent-Györgyi A.: Vitamin nature of flavones, *Nature*, 1936, 138, 798.
576. Rutgeerts P., Geboes K.: Understanding inflammatory bowel disease – the clinician's perspective, *Eur. J. Surg. Suppl.*, 2001, 586, 66-72.
577. Saas Fee Deklaration, In: E. Cadenas & L. Packer eds. *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker, Inc, NY. 1996.
578. Sahu, S.C., Gray, G.C.: Kaempferol-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation, *Cancer Lett*, 1994, 85, 159-164.
579. Saito, M., Yamaguchi, M. Liwer microsomal mixed-function oxidases in response to dietary n-3 fatty acid levels in rats, *Ann. Nutr. Metab.*, 1994, 38, 212-220.
580. Sakagami, H., Jiang, Y., Kusama, K., Atsumi, T., Ueha, T., Toguchi, M., Iwakura, I., Satoh, K., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T.: Cytotoxic activity of hydrolysable tannins against human oral tumor cell lines: A possible mechanism, *Phytomed.*, 2000, 7, 39- 47.
581. Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G.P., Rice-Evans C.: Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants, *Arch. Biochem. Biophys.* 1995, 322, 339-346.
582. Salamon P., Kornbluth A.A., Janowitz H.D.: Treatment of ulcerative colitis with fish oil n-3-omega fatty acid: an open trial, *J. Clin. Gastroenterol.*, 1990, 12, 157-161.
583. Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Kadam, S.S. eds. *Dietary tannins: consequences and remedies*, CRC Press, Boca Raton, 1990.
584. Salvemini D., Misko T.P., Masferrer J.L., Seibert K., Currie M.G., Needleman P.: Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 7240-7244.
585. Samuelsson B.: Leucotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation, *Science*, 1983, 220, 568-575.

586. Samuelsson B., Goldyne M., Granström E., Hamberg M., Hammarström S., Malmsten C.: Prostaglandins and tromboxanes, *Ann. Rev. Biochem.*, 1978, 47, 997-1029.
587. Sandborn W.J.: Strategies for targeting tumour necrosis factor in IBD, *Best Pract. Res. Clin. Gastroent.*, 2003, 17, 105-117.
588. Sanhueza J., Valdes J., Campos R., Garrido A., Valenzuela A.: Changes in the xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase ratio in the rat kidney subjected to ischemia-reperfusion stress: preventive effect of some flavonoids, *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1992, 78, 211-218.
589. Sárváry Enikő: Szabadgyök-reakciók jelentősége a máj- és vese transzplantációban, Ph.D. Tézisek, Budapest, 2001.
590. Sárváry E., Blázovics A., Rempert A., Járay J., Nemes B., Földes K., Sulyok B., Varga M., Fehérváry I., Kóbori L., Lakatos M., Perner F.: Importance of free radical reactions in renal and liver transplantation, 16. Danube Symposium on Nephrology, Bled, Sept. 2002, 19-22. (Bruno Watschinger Award for the Best Poster)
591. Sárváry E., Blázovics A., Varga M., Sulyok B., Járay J., Lakatos M., Perner F.: Glutation-S-transzferázok diagnosztikus jelentősége, *Orvosi Hetilap*, 1998, 139, 25, 1531-1539.
592. Sass J.O., Tzimas G., Nau H.: 9-cis-retinoyl-beta-D-glucuronide is a major metabolite of 9-cis-retinoic acid, *Life Sci.*, 1994, 54, 69-74.
593. Sato Y., Arai H., Miyata A., Tokita S., Yamamoto K., Tanabe T., Inoue K.: Primary structure of alfa-tocopherol transfer protein from rat liver. Homology with cellular retinaldehyde-binding protein, *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 17705-17710.
594. Schroeder J.J., Cousins R.J.: Interleukin 6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 3137-3141.
595. Schmidt J., Diehl A.: Cytokines and alcoholic liver disease, *Semin. Liver Dis.*, 1993, 13, 170-182.
596. Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Riehemann, K., Wesselborg, S.: Regulation of NF-kB activation by MAP kinase cascades, *Immunobiol.*, 1997, 198, 35-49.
597. Sedlak J., Lindsay R.H.: Estimation of total protein bound and non protein sulfhydryl groups in tissues with Ellmann's reagent, *Anal. Biochem. Biophys.*, 1985, 25, 192-205.
598. Sharid R.: Bilirubin metabolism. State of the art, *Gastroenterology*, 1978, 74, 1307-1310.
599. Sharma M.K., Buettner G.R.: Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: an ESR study, *Free Rad. Biol. Med.*, 1993, 14, 649-53.
600. Shen M.L.: Biological activities of Astragalus polysaccharides, *Chung Hsi I Chien Ho Tsa Chih*, 1987, 7, 5, 268-269.
601. Shen T., Lin C., Yang Z., Weng S., Lu J., Shen G., Gu Y., Xu Z., Fu X., Wang K., Wu J., Zhou X.: Presence of free radicals in pigment gallstone in vivo, *Chin. Med. J. Engl.*, 1996, 109, 6, 446-449.
602. Shimada K., Fujikawa K., Yahara K., Nakamura T.: Antioxidant properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40, 945-948.
603. Shimano H., Yamada N., Motoyoshi K.: Plasma cholesterol-lowering activity of monocyte colony stimulating factor (M-CSF), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1990, 587, 362-371.
604. Shimizu T., Izuimi T., Seyama Y., Tadokoro K., Radmark O., Samuelson B.: Characterization of leucotriene A4-synthase from murine mast cells, Evidence for its identity to arachidonate 5-lipoxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 183, 4175-4179.

605. Shimoi K., Okada H., Kaneko J., Furugori., Goda T., Takase S., Suzuki M., Hara Y., Kinae N.: Bioavailability and antioxidant properties of luteolin. In: Natural Antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease, (ed.: Kumpulainen, J. T., Salonen, J. T.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999, 166-173.
606. Shoda R., Matsueda K., Yamato S., Umeda N.: Therapeutic efficacy of N-3 polyunsaturated fatty acid in experimental Crohn's disease, *J. Gastroenterol.*, 1995, 30, Suppl, 8, 98-101.
607. Shu H.Y.: *Oriental Materia Medica, A Concise Guide*, Palos Verdes, C.A: Oriental Healing Arts Press, 1986, 521-523.
608. Sigel A., Sigel M.: *Metal ions in biological systems*, Marcel Dekker Inc. NY, Basel. 1999.
609. Sies H., Murphy M.E.: Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage, *J. Photochem. Photobiol. Biol.*, 1991, 8, 211-224.
610. Siguel E.N., Lerman R.H.: Prevalence of essential fatty acid deficiency in patients with chronic gastrointestinal disorders, *Metabolism*, 1996, 45, 12-23.
611. Simopoulos A.P., Ordovas J.M.: *Nutrigenetics and nutrigenomics*, World Review of Nutrition and Dietetics, Vol. 93. Karger, 2004.
612. Sipos P.: *Az epe szabadgyökös változásai epekövességben és hatása a bélnyálkahártyára*, Ph.D. Tézisek, 2001.
613. Sipos P., Gamal E.M., Blázovics A., Metzger P., Mikó I., Furka I.: Free radical reactions in the gallbladder, *Acta Chirug. Hung.*, 1997, 36, 329-330.
614. Sipos P., Hagymási K., Blázovics A., Fehér J.: Cholecystitis, gallstones and free radical reactions in human gallbladder, *Med. Sci. Monit.*, 2001a, 7, 1, 84-88.
615. Sipos P., Hagymási K., Lugasi A., Fehér E., Örsi F., Blázovics A.: Direct effect of bile colon mucosa in alimentary induced hyperlipidemia in rats, *Acta Alimentaria*, 2001b, 1, 25-35.
616. Sipos P., Hagymási K., Lugasi A., Fehér E., Blázovics A.: Effect of black radish root (*Raphanus sativus* L. var *niger*) on the colon mucosa in rats fed a fat rich diet, *Phytotherapy Research*, 2002, 16, 7, 677-679.
617. Sipos P., Szentmihályi K., Fehér E., Abaza M., Szilágyi M., Blázovics A.: Some effects of lead contamination on liver and gallbladder bile, *Acta Biol. Szegediensis*, 2003, 47, 1-4, 139-142.
618. Slater T.F., Cheeseman K.H., Benedetto C., Collins M., Emery S., Maddix S.P., Nodes J.T., Proudfoot K., Burton G.W., Ingold K.U.: Studies on the hyperplasia ('regeneration') of the liver following partial hepatectomy. Changes in lipid peroxidation and general biochemical aspects, *Biochem. J.*, 1990, 1, 265, 51-59.
619. Slater T.F., Eakins M.N.: Interactions of (+)-cyanidanol-3 with free radical generating system, In: Bertelli A., ed.: *New Trends in the Therapy of Liver Diseases*, Karger, Basel, Switzerland, 1983, 84-89.
620. Small D.M.: The formation of gallstones, *Adv. Int. Med.*, 1970, 16, 243-264.
621. Smith M.: Genetics of human alcohol and aldehyde dehydrogenases, *Adv. Hum. Genet.*, 1986, 15, 249-290.
622. Smith W.L., Marnett L.J.: Prostaglandin endoperoxide synthase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1083, 1-17.
623. Smith W.L., Marnett L.J., DeWitt D.L.: Prostaglandin and thromboxane biosynthesis, *Pharmacol Ther.*, 1991, 49, 153-79.
624. Smith D., O'Leary V.J., Darley-Usmar V.M.: The role of alpha-tocopherol as a peroxy radical scavenger in human low density lipoprotein, *Biochem. Pharmacol.*, 1993, 45, 2195-2201.

625. Somogyi A., Ecsedi G.G., Blázovics A., Miskolczi K., Gergely P., Fehér J.: Short term treatments of type II. hyperlipidemia with Silymarin, *Acta Med. Hung.*, 1989, 46, 4, 289-295.
626. Somogyi A., Gonzalez-Cabello R., Szondy É., Blázovics A., Gergely P., Fehér J.: Effects de la hiperlipémia sobre la blastogénesis inducida por mitógenos, en linfocitos aislados de basos de ratón, *Allergol. Immunopathol.*, 1987, 15, 89-92.
627. Sonnenbichler J., Goldberg M., Hane L., Madibunyi I., Vogl S., Zetl I.: Stimulatory effect of silibinin on the DNA synthesis in partially hepatectomized rat livers: non-response in hepatoma and other malign cell lines, *Biochem. Pharmacol.*, 1986, 35, 538-541.
628. Sonnenbichler J., Zetl I.: Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Silibinin: V. Einflub von Silibinin auf die Synthese ribosomaler RNA, mRNA und tRNA in Rattenlebern in vivo, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 1984, 365, 555-566.
629. Sonnenbichler J., Zetl I.: Specific binding of a flavonolignane derivative to an estradiol receptor, In: *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II.: Biochemical, Cellular, and Medicinal Properties*. Alan. R. Liss. Inc., 1988, 369-374.
630. Sréter L., Zintl K.: A táplálkozás szerepe a daganatos betegségek kialakulásában és megelőzésében, *Golden Book Kiadó, Budapest*, 1998.
631. Stefanovits-Bányai É., Bertényi-Divinyi Zs., Kiss A.S., Blázovics A., Koczka N.: Comparison of calcium, magnesium, potassium and sodium contents of Ginkgo biloba L. leaves from Hungary, *J. Elementol.*, 2002, 7, 1, 49-56.
632. Stefanovits-Bányai É., Bereczky L., Szecsko V., Sztéfanov A., Bertényi-Divinyi Zs., Blázovics A., Koczka N.: Effect of environmental pollution on phytochemical and element analysis of Ginkgo biloba L. from Hungary, In *Proc 10th International Trace Element Symposium, Budapest*, ed.: I. Pais, 2002a.
633. Stefanovits-Bányai É., Koczka N., Szecsko V., Sztéfanov A., Bertényi-Divinyi Zs., Blázovics A.: Phytochemical and element analysis of Ginkgo biloba L. from Hungary, In *Proc 10th International trace Element Symposium, Budapest*, ed.: I. Pais, 2002b.
634. Stefanovits-Bányai É., Szentmihályi K., Hegedűs A., Koczka N., Váli L., Taba G., Blázovics A.: Metal ion and antioxidant alterations in leaves between different genders of Ginkgo biloba L. (Ginkgoaceae), *Life Sci.*, 2005 (elküldve)
635. Stenson W.F., Cort D., Rodgers J., Burakoff R., DeSchryver-Kecskemeti K., Gramlich T.L., Beeken W.: Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis, *Ann. Intern. Med.*, 1992, 116, 609-614.
636. Stocker R., Peterhans E.: Antioxidant properties of conjugated bilirubin and biliverdin biologically relevant scavenging of hypochlorous acid, *Free. Rad. Res. Com.*, 1989, 6, 57-66.
637. Stocker R., Yamamoto Y, McDonagh A.F., Glazer A.N., Ames B.N.: Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance, *Science*, 1987, 235, 1043-1046.
638. Stohr H., Herrmannn K.: On the phenolic acids of vegetables. III. Hydrocinnamic acids and hydrobenzoic acids of root vegetables, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1975, 159, 218-224.
639. Stohs, S.J., Bagchi, D.: Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Rad. Biol. Med.*, 1995, 18, 321- 336.
640. Straus D.S., Pascual G., Li M., Welch J.S., Ricote M., Hsiang C.H., Sengchanthalangsy L.L., Ghosh G., Glass C.K.: 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000, 25, 97, 9, 4844-4849.
641. Stravitz R.T., Sanyal A.J.: Drug induced steatohepatitis, *Clin. Liver Dis.*, 2003, 7, 435-451.
642. Sturniolo G.C., Mestriner C., Lecis P.E., D'Odorico A., Venturi C., Irato P., Cecchetto A., Tropea A., Longo G., D'Inca R.: Altered plasma and mucosal concentrations of trace elements and antioxidants in active ulcerative colitis, *Scan. J. Gastroenterol.*, 1998, 33, 644-649.

643. Suh Y.A.H., Arnold R.S., Lassegue B. Shi J., Xu X., Sorescu D., Chung A.B., Griendling K.K., Lambeth JD.: Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 1999, 401, 79-82.
644. Szabó L.Gy.: Immunstimuláns poliszacharidokat tartalmazó gombák, *Mikológiai Közlemények* 1987, 2/3 151-158.
645. Szczurek E.I., Bjornsson C.S., Taylor C.G.: Dietary zinc deficiency and repletion modulate metallothionein immunolocalization and concentration in small intestine and liver of rats, *J. Nutr.*, 2001, 131, 2132-2138.
646. Szent-Györgyi A.: The living state and cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 2844-2847.
647. Szent-Györgyi A.: 1941, In: Nagy I.Z.: Semiconduction of proteins as an attribute of the living state: the ideas of Albert Szent-Györgyi revisited in light of the recent knowledge regarding oxygen free radicals, *Exp Gerontol.*, 1995, 30, 327-335.
648. Szentmihályi K., Blázovics A., Hajdú M., Szöllősi R., Rapavi E., Then M.: Makro- és mikroelemvizsgálatok jelentősége a gyógynövénykutatásban, *Mikroelemek a táplálékláncban*, Szerk. Simon L., Szilágyi M. 2003, 252-260.
649. Szentmihályi K., Blázovics A., Kéry A., Lugasi A., Vinkler P.: Antioxidant activity of *Sempervivum tectorum* and *Raphanus sativus* extracts in vitro and in vivo. *SFRR 2000c*. Oct. 16-20, 2000 pp 5. Kyoto, Japan (Award For the 5th. Best Poster)
650. Szentmihályi K., Blázovics A., Kocsis I., Fehér E., Lakatos B., Vinkler P.: The effect of fat rich diet and alcohol on ion concentration in bile fluid in rats, *Acta Aliment.*, 2000, 29, 359-366.
651. Szentmihályi K., Blázovics A., Lugasi A., Kéry Á., Lakatos B., Vinkler P.: Effect of natural polyphenol-type antioxidants (*Sempervivum tectorum* and *Raphanus sativus* L. var. *niger* extracts) on metal ion concentrations in rat bile fluid, *Current Topics in Biophysics*, 2000b, 24, 2, 203-207.
652. Szentmihályi K., Blázovics A., Vinkler P.: Free radical properties of metal complexes, *Acta Biologica Szegediensis*, 2003a, 47, 1-4, 107-109.
653. Szentmihályi K., Fehér E., Vinkler P., Kéry Á., Blázovics A.: Metabolic alterations of toxic and none essential elements by the treatment of *Sempervivum tectorum* extract in hyperlipidemic rat model, *Toxicol. Pathol.*, 2004, 32, 1, 50-57.
654. Szentmihályi K., Kéry Á., Then M., Lakatos B., Sándor Z., Vinkler P.: Potassium-sodium ratio for the characterization of medicinal plant extracts with diuretic activity, *Phytother. Res.*, 2000a, 12, 163-166.
655. Szentmihályi K., Ladó K., Rapavi E., Taba G., Kocsis I., Stefanovits-Bányai É., Bíró E., Pintér E., Bárkovits S., Blázovics A.: Gyógynövények ásványi elemtartalmának vizsgálata és értékelése a komplex prevenciós kutatásokkal összefüggésben, *Széchenyi Szimpózium*, 1/016. NKFP 2004a.
656. Szentmihályi K., Sípó P., Blázovics A., Vinkler P., Szilágyi M.: Concentration of biliary metal elements and gallstone formation in humans (cholelithiasis), *Trace Elem. Electr.*, 2002, 19, 3, 160-164.
657. Szentmihályi K., Then M.: Study of the constituents on mineral elements and biologic active substances and their extraction in some plants, *J. Oil, Soap, Cosmetics*, 1999, 48, 173-176.
658. Szentmihályi K., Then M.: Teas of *Equiseti herba*, *Myrtilli folium* and *Salviae folium*, *Acta Aliment. Hung.*, 2000c, 29, 43-49.
659. Szilvás Á.: Gasztrointesztinális daganatok szabad gyök, tumormarker és háromdimenziós ultrahangvizsgálata, *Ph.D. Tézisek*, Budapest, 2001.
660. Szilvás Á., Blázovics A., Székely Gy., Dinya E., Fehér J., Mózsik Gy.: Comparative study between the free radicals and tumor markers in patients with gastrointestinal tumors, *J. Physiology Paris.*, 2001a, 95, 247-252.

661. Szilvás Á., Blázovics A., Székely Gy., Fehér J.: Free radical status and tumour markers in gastrointestinal tumours, European Congress, I.H.P.B.A. Budapest, 1999. Editors: L. Flautner, P.K. Kupcsulik, I. Rózsa, Monduzzi Editore. International Proceeding Division, 1999, 409-412.
662. Szilvás Á., Székely Gy., Szilvási I., Sági S., Jakab F.: The Importance of follow-up examinations in patients with carcinoid tumor, *Hepato-Gastroenterology*, 2003, 50, 1452-1453
663. Szilvás Á., Székely Gy., Tarján Z., Foprnert B.: Three-dimensional ultrasosography, virtual colonoscopy and endorectal magnetic resonance imaging in the diagnosis of complicated inflammatory bowel disease, *Endoscopy*, 2002, 34, 94.
664. Taga K., Tosato G.: IL-10 inhibits human T-cell proliferation and IL-2 production, *J. Immunol.*, 1992, 148, 1143-1148.
665. Takahashi T., Lasker J.M., Rosman A.S., Lieber C.S.: Induction of cytochrome P-4502E1 in the human liver by ethanol is caused by a corresponding increase in encoding messenger RNA, *Hepatology*, 1993, 17, 236-245.
666. Takahashi M., Yoshikawa Y., Niki E.: Crossover effect of tocopherol in the spontaneous oxidation of methyl linoleate, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1989, 62, 1885-1890.
667. Takashima T., Fujiwara Y., Higuchi K., Arakawa T., Yana Y., Hasuma T., Otani S.: PPAR- γ ligands inhibit growth of human esophageal adenocarcinoma cells through induction of apoptosis, cell-cycle arrest and reduction of ornithine decarboxylase activity, *Int. J. Oncol.*, 2001, 19, 465-471.
668. Tarr F.: A flavonoidok, Nyíregyháza-Debrecen, ISSN:N0 9636409765, 2002, 1-214.
669. Tengerdy R.P.: The role of vitamin E in immune response and disease resistance, *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 1990, 587, 24-33.
670. Terao J., Matsushita S.: The peroxidizing effect of α -tocopherol on autooxidation of methyl linoleate in bulk phase, *Lipids*, 1986, 21, 255-260.
671. Te Sligte K., Bourass I., Sels J.P., Driessen A., Stockbrugger R.W., Koek G.H.: Non-alcoholic steatohepatitis: review of a growing medical problem, *Eur. J. Intern. Med.*, 2004, 15, 10-21.
672. Tetsuka T., Daphma-Iken D., Srivastava S.K., Baier L.D., DuMaine J., Morrison A.R.: Cross-talk between cyclooxygenase and nitric oxide pathways: prostaglandin E2 negatively modulates induction of nitric oxide synthase by interleukin 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 12168-12172.
673. Theocharis S., Margeli A., Panayiotidis P.: Effects of various metals on DNA synthesis and lymphokines production by human peripheral blood lymphocytes in vitro, *Comp Biochem Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 1991, 99, 131-133.
674. Tijburg L.B., Nyathi C.B., Meijer G.W., Geele M.J.: Biosynthesis and secretion of triacylglycerol in rat liver after partial hepatectomy, *Biochem. J.* 1991, 1, 277, 3, 723-728.
675. Timberlake, C. F.: Anthocyanins - occurrence, extraction and chemistry, *Food Chemistry*, 1980, 5, 69-80.
676. Tominaga M., Iida M., Aoyagi K., Kohrogi N., Matsui T., Fujishima M.: Red cell folate concentrations in patients with Crohn's disease on parenteral nutrition, *Postgrad. Med. J.*, 1989, 65, 818-820.
677. Tookey H.L., Van Etten CH., Daxenbichler ME.: Glucosinolates. In: Toxic constituents of plant foodstuff, (ed.: Liener IE.), Academic Press, New York, 103-142, 1980,
678. Torel J., Cillard J., Cillard P.: Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radicals, *Phytochemistry*, 1986, 25, 383-385.
679. Tölgyesi Gy.: A növények mikroelem-tartalma és ennek mezőgazdasági vonatkozásai, *Mezőgazdasági Kiadó, Budapest*, 1969, 1-189.

680. Tracey K.J., Cerami A.: Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target, *Annu. Rev. Med.*, 1994, 45, 491-503.
681. Tragnone A., Valpiani D., Miglio F., Elmi G., Bazzocchi G., Pipitone E., Lafranchi G. A.: Dietary habits as risk factors for inflammatory bowel disease, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1995, 7, 47-51.
682. Trotman B.W.: Formation of pigment gallstones. In: Cohen S., Soloway R.D. ed.: *Gallstones*, New York, 1985, pp. 299-309.
683. Tsuchiya M., Scita G., Freisleben H.J., Kagan V.E., Packer L.: Antioxidant radical-scavenging activity of carotenoids and retinoids compared to α -tocopherol, *Methods Enzymol.*, 1992, 213, 460-472.
684. Tsuritani I., Ikai E., Date T., Suzuki Y., Ishizaki M., Yamada Y.: Polymorphism in ALDH2-genotype in Japanese men and the alcohol-blood pressure relationship, *Am. J. Hypertens.*, 1995, 8, 1053-1059.
685. Tüzün A., Erdil A., İnal V., Aydin A., Bagci S., Yesilova Z., Sayal A., Karaeren N., Dagalp K.: Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease, *Clin. Biochem.*, 2002, 35, 569-572.
686. Vanaja D.K., Grossmann M.E., Celis E., Young C.Y.: Tumor prevention and antitumor immunity with heat shock protein 70 induced by 15-deoxy-delta^{12,14}-prostaglandin J2 in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate cells, *Cancer Res.*, 2000, 1, 60, 4714-4718.
687. van Acker S.A.B.E., Koymans L.M.H., Bast A.: Molecular pharmacology of vitamin E: Structural aspects of antioxidant activity, *Free Rad. Biol. Med.*, 1993, 15, 311-328.
688. van Berge Henegouven G.B., van der Werf S.D.J., Ruben A.T.: Fatty acid composition of phospholipids in bile in man: promoting effect of deoxycholate on arachidonate, *Clin. Chim. Acta.*, 1987, 165, 27-37.
689. Van de Wal Y., Van der Sluys Veer A., Verspaget H.W., Mulder T.P., Griffioen G., van Tol E.A., Pena A.S., Lamers C.B.: Effect of zinc therapy on natural killer cell activity in inflammatory bowel disease, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1993, 37, 281-286.
690. Van der Ouderaa F.J., Buytenhek M., Nugteren D.H., Van-Dorp D.A.: Purification and characterisation of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1997, 487, 315-331.
691. Vanherweghem, J.L., Depierreux, M., Tielemeans, C., Abramovicz, D., Dratwa, M., Jadoul, M., Richard, C., Vandervelde, D., Verbeelen, D., Vanhaelen-Fastre, R., Vanhaelen M.: Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including, Chinese herbs. *Lancet*, 1993, 341, 387- 391.
692. Vargas R., Perez R.M., Perez S., Zavala M.A, Perez C.: Antirolithiatic activity of *Raphanus sativus* aqueous extract on rats, *J. Ethnopharmacol.*, 1999, 68, 335-338.
693. Varró A.B.: *Gyógynövények gyógyhatásai*, Black and White Kiadó, Budapest, 1991.
694. Vásárhelyi B., Blázovics A., Fehér J.: Az A-vitamin analóg - és származék család jelentősége a sejtműködés szabályozásában, *Orvosi Hetilap*, 1993, 134, 845-848.
695. Veness-Meehan K.A., Cheng E.R., Mercier C.E., Blixt S.L., Johnston C.J., Watkins R.H., Horowitz S.: Cell-specific alterations in expression of hyperoxia-induced mRNA of lung, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1991, 5, 516.
696. Vereckei A., Blázovics A., György I., Fehér E., Tóth M., Szénási G., Kuppusamy P., Besh H.R., Jay Jr., Zweier L., Zipes D.P., Fehér J.: The role of free radicals in the pathogenesis of amiodarone toxicity, Oxygen stress and tissue damage, *Akadémiai Kiadó, Budapest*, 1994. 19-63.
697. Vereckei A., Blázovics A., György I., Fehér J., Tóth M., Szénási G., Zsinka Á., Földiák G., Fehér J.: The role of free radicals in the pathogenesis of Amiodarone toxicity, *J. Cardiovasc. Electrophysiol*, 1993, 161-177.

698. Vereckei A., Blázovics A., Szénási G., Kónya L., Láng I. Zsinka Á., Fehér J.: Az amiodaron által előidézett oxidatív stressz állapot szerepe a gyógyszer mellékhatásaiban, *Orvosi Hetilap*, 1991, 132, 9, 483-488.
699. Vereckei A., Fehér E., Blázovics A., György I., Toncsev H., Fehér J.: Free radical reactions in the pathomechanism of amiodarone liver toxicity, In: *Free Radicals and Liver*, ed.: G. Csomós and J. Fehér, Springer-Verlag, Berlin, 1992, 127-154.
700. VERIS, Vitamin E Fact Book, La Grange, IL USA, 1995.
701. Viarengo A., Burlando B., Ceratto N. Panfoli I.: Antioxidant role of metallothioneins: A comparative overview, *Cell. Mol. Biol.*, 2000, 46, 407-417.
702. Vitetta L., Sali A.: Primary bile duct stones and bacterial activity, *HPB Surg*, 1992, 6, 23-32.
703. Wagner M., Klein C.L., Kleinert H., Euchenhofer C., Forstermann U., Kirkpatrick C.J.: Heavy metal ion induction of adhesion molecules and cytokines in human endothelial cells, *Pathobiology*, 1997, 65, 241- 252.
704. Wagner H. Proksch A., Riess-Mauer L., Vollmar A.: Immunstimulierend wirkende Polysaccharide (Heteroglykane) aus höheren Pflanzen, *Arzneim. Forsch.*, 1984, 34, 659-661.
705. Waladkhani A.R., Kunz P., Zimmermann W., Clemens, M.R.: Changes in human serum alcohol dehydrogenase activity during retinoic acid treatment of cancer patients. *Alcohol. Alcohol.*, 1997, 32, 6, 739-743.
706. Wang T.K., Weiner H., Gorenstein D.G.: Import, processing, and two-dimensional NMR structure of a linker-deleted signal peptide of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 19906-19914.
707. Warmsley R.S., Ayres R.C.S.: A simple clinical colitis activity index, *Gut*, 1998, 43, 29-32.
708. Watanabe H., Nagoshi T., Agatsuma S., Kabayashi M., Inaba H.: Bilirubin chemiluminescence induced by the attack of active oxygen species, *J. Biolum. Chemilum.*, 1992, 7, 13-19.
709. Watanabe H., Usa M., Kobayashi M., Agatsuma S., Inaba H.: Weak chemiluminescence of bilirubin and its stimulation by aldehydes, *J. Biolum. Chemilum.*, 1992a, 7, 1-11.
710. Wei S., Episkopon V., Piantedosi R., Maeda S., Shimada K., Gottesman M.E., Blaner W.S.: Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination, *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 866-870.
711. Weiss R.F.: *Lehrbuch der Phytotherapie*, 4. Auflage. Hippokrates-Verlag, Stuttgart, 1985, 125.
712. Whitfield J.B.: Meta-analysis of the effects of alcohol dehydrogenase genotype on alcohol dependence and alcoholic liver disease, *Alc. Alcohol.*, 1997, 32, 613-619.
713. Whittel B.J.R., Lopez-Belmonte J., Moncada S.: Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat, *Br. J. Pharmacol.*, 1990, 99, 607-611.
714. Wild A.C., Mulcahy R.T.: Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: Insights into transcriptional control of antioxidant defenses, *Free Rad. Res.*, 2000, 32, 4, 281-301.
715. Wildman R.E.C., Mao S.: Tissue-specific alterations in lipoprotein lipase activity in copper-deficient rats, *Biol. Trace. Elem. Res.*, 2001, 80, 221-229.
716. Willhite, C.C.: Teratogenic potential of quercetin in the rat, *Food Chem. Toxicol.*, 1982, 20, 75-79.
717. William J.W.J.: Strategies for targeting tumour necrosis factor in IBD, *Best Practice Res. Clin. Gastroenterol.*, 2003, 17, 105-117.

718. Winkler B.S., Orselli S.M., Rex T.S.: The redox couple between glutathione and ascorbic acid: A chemical and physiological perspective, *Free Rad. Biol. Med.*, 1994, 17, 333-349.
719. Witting L.A.: Vitamin E and lipid antioxidants in free radical initiated reactions. In *Free radicals in biology*, Szerk. Pryor A. New York Acad. Press, 1980, 295-319.
720. Wolf A., Pohlandt F.: Bacterial infection, the main cause of acute cholestasis in newborn infants receiving short term parenteral nutrition, *J. Pediatr. Gastroenterol.*, 1989, 8, 297-303.
721. Wolfe F., Michaud K., Anderson J., Urbansky K.: Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy, *Arthritis Rheum.*, 2004, 50, 372-379.
722. Wong N.A., C.S. Rae F., Simpson K.I., Murray G.D., Harrison D.I.: Genetic polymorphisms of cytochrome P450 EI and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a white population: a study and literature review, including meta-analysis, *Molecular Pharmacology*, 2000, 53, 2, 88-93.
723. Worrall S., de Jersey J., Nicholls R., Wilce P.A.: Acetaldehyde/protein interactions: are they involved in the pathogenesis of alcoholic liver disease? *Dig. Dis.*, 1993, 4-5, 265-277.
724. Worrall S., de Jersey J., Shanley B.C.: Alcohol abusers exhibit a higher IgA response to acetaldehyde-modified proteins, *Alc. Alcohol. Suppl.*, 1991, 1, 261-264.
725. Worrall S., Wilce P.A.: The effect of chronic ethanol feeding on cytokines in a rat model of alcoholic liver disease, *Alc. Alcohol. Suppl.*, 1994, 2, 447-451.
726. Wrenn K.D., Slovis C.M., Minion G.E., Rutkowski R.: The syndrome of alcoholic ketoacidosis, *Am. J. Med.*, 1991, 91, 119-128.
727. Yamanaka H.: Alcohol ingestion and hyperuricemia, *Nippon Rinsho*, 1996, 54, 3369-3373.
728. Yamashita K., Nohara Y., Katayama K., Namiki M.: Sesame seed lignans and γ -tocopherol act synergistically to produce vitamin E activity in rats, *J. Nutr.*, 1992, 122, 2440-2446.
729. Yang L.L., Lee C.Y., Yen, K.Y.: Introduction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells, *Cancer Lett.*, 2000, 157, 65- 75.
730. Yang Z.H., Wang K., Liu X.T.: Studies of electron spin resonance on bilirubin free radicals, *Sci. China B*, 1992, 35, 1093-1100.
731. Yin S.I., Chou F.J., Chao S.F., Tsai S.F., Liao C.S., Wang S.L., Wu C.W.: Alcohol and aldehyde dehydrogenases in human esophagus: comparison with the stomach enzyme activities, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 1993, 17, 376-381.
732. Yin S.I., Liao C.S., Lee Y.C., Wu C.W., Jao S.W.: Genetic polymorphism and activities of age differences human colon alcohol and aldehyde dehydrogenases: no gender and alcohol, *Clin. Exp. Res.*, 1994, 18, 1256-1260.
733. Yin S.J., Liao C.S., Wu C.W., Li T.T., Chen L.L., Lai C.L., Tsao T.Y.: Human stomach alcohol and aldehyde dehydrogenases: comparison of expression pattern and activities in alimentary tract, *Gastroenterology*, 1997, 112, 766-775.
734. Yoshida A.: Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes related to alcohol sensitivity and alcoholic diseases, *Alc. Alcohol.*, 1994, 29, 693-696.
735. Yoshida A., Hsu L.C., Dave V.: Retinal oxidation activity and biological role of human cytosolic aldehyde dehydrogenase, *Enzyme*, 1992, 46, 239-244.
736. Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu L.C., Chang C.: Human aldehyde dehydrogenase gene family, *Eur. J. Biochem.*, 1998, 251, 549-557.
737. Yuan R., Grunwald J.: Germany Moves to the Forefront of the European Herbal Medicine Industry, *Genet. Eng. News*, 1997, 14.

738. Zheng G.Q.: Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*, *Planta Med.*, 1994, 60, 1, 54-57.
739. Zingg J.M., Azzi A.: Non-antioxidant activities of vitamin E, *Current Medicinal Chemistry*, 2004, 11, 1113-1133.
740. Zsinka Á.J.N., Blázovics A., Biacs P.: Chemiluminescence phenomena in animal tissues of different quality, *Hung. Sci. Instr.*, 1988, 64, 11-13.
741. Zsinka J.N.A., Blázovics A., Dworschák E., Biacs P.: Investigation of lipoperoxidative changes in edible oils, In: *Role of Free Radicals in Biological Systems*, ed.: Fehér J., Blázovics A., Matkovics B., Mézes M., Akadémiai Kiadó, Budapest, 1992, 107-115.
742. Zsinka J.N.Á., Blázovics A., Lugasi A., Hóvári J., Dworschák E.: Szabadgyök reakciótermék vizsgálata olajokban, *Olaj, szappan, kozmetika*, 1995, 44, 11-13.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszintén köszönöm Prof. Dr. Tulassay Zsolt egyetemi tanárnak, a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika igazgatójának, hogy támogatta kutatásaimat és biztatott doktori tézisem elkészítésére. Hálásan köszönöm Prof. Dr. Fehér János egyetemi tanárnak, a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika volt igazgatójának, hogy 1982 óta figyelemmel kísérte munkámat, szakmailag, erkölcsileg támogatott, meghívott intézetébe és felkért témavezetőnek Ph.D. programjába. Köszönettel tartozom néhai Prof. Dr. Horváth István egyetemi tanárnak, a Semmelweis Egyetem II. Kémiai-Biokémia Intézet volt igazgatójának és néhai Prof. Dr. Gerő Sándor egyetemi tanárnak, a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Arteriosclerosis Kutatócsoport volt igazgatójának, főnökeimnek, hogy elindítottak kutatói pályámon, magatartásukkal és tudásukkal példát mutattak számomra. Hálás vagyok minden munkatársamnak, akik e hosszú kutatói periódus alatt támogattak, bátorítottak, és segítségemre voltak. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Szőke Éva egyetemi tanárnak a Semmelweis Egyetem Farmakognóziái Intézet igazgatójának, Dr. Kéry Ágnes (Ph.D.) a Semmelweis Egyetem Farmakognóziái Intézet professzorának, Prof. Dr. Petri Gizellának, a Semmelweis Egyetem Farmakognóziái Intézet volt igazgatójának, a közös kutatások élményeiért és baráti támogatásokért. Hálás köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Fehér Erzsébet egyetemi tanárnak, a Semmelweis Egyetem Szövet-és Fejlődéstani Intézet professzorának a több mint húszéves barátságért, a közös kísérletekben nyújtott felbecsülhetetlen segítségért. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Antus Sándorak, a Debreceni Tudományegyetem professzorának és Dr. György István kandidátusnak, a Magyar Tudományos Akadémia Központi Fizikai Kutatóintézet volt munkatársának a közös kutatásokért. Köszönöm Prof. Dr. Örsi Ferencnek a BME Biokémiai Tanszék professzorának a gázkromatográfiás és HPLC vizsgálatoknál nyújtott felbecsülhetetlen segítségét. Ugyancsak köszönettel tartozom Dr. Samu Zsuzsának a Gyógynövénykutató Intézet volt vegyészmérnökének, aki a bilirubinnal kapcsolatos HPLC on-line UV spektrumokat elkészítette. Hálásan köszönöm Prof. Dr. Gergely Péter egyetemi tanárnak és Dr. Rhenso Gonzalez-Cabello kandidátusnak az immunológia kutatásokban nyújtott felbecsülhetetlen segítséget. Hálás vagyok Prof. Dr. Vinkler Péter egyetemi tanárnak, a Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Kutatóintézete tudományos igazgatójának, hogy felkért, vegyek részt tudományos programjában a fémionkutatás területén. Támogatta kutatásaimat, lehetővé tette munkám kiszélesítését e területen. Őszinte köszönet illeti kedves munkatársamat, Dr. Szentmihályi Klárát, az Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Kutatóintézete tudományos csoportvezetőjét, őszinte barátságáért, segítőkészségéért, a közös tudományos tervek megvalósításáért. Hálás vagyok tanítványaimnak őszinte barátságukért, kedvességükért, szorgalmukért, tudásukért, akiktől nagyon sokat tanultam. Köszönöm Dr. Lugasi Andrea Ph.D., az Országos Élelmezés-és Táplálkozástudományi Intézet Élelmiszerkémiai Analitikai Főosztálya főosztályvezető helyettesének, régi kedves munkatársamnak, Dr. Szilvás Ágnes Ph.D., a Szent János Kórház és Rendelőintézet I. Belgyógyászati Osztálya főorvosának, Dr. Hagymási Krisztina Ph.D., a

Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika orvosának, Dr. Sárváry Enikő Ph.D., a Semmelweis Egyetem Transzplantációs Klinika tudományos főmunkatársának, Dr. Kriska Tamás Ph.D., az Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Kutatóintézete tudományos főmunkatársának, Dr. Sípos Péter Ph.D., a Semmelweis Egyetem Sebészeti Klinika adjunktusának, Dr. Kocsis Ibolya Ph.D., a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika Központi Laboratórium vezetőjének, Székely Edit Ph.D. hallgatónak, a MÁV Kórház és Rendelőintézet munkatársának, Rapavi Erika Ph.D. hallgatónak, jelenleg is velem dolgozó munkatársnak, Dr. Horváth Mónika kandidátusnak, a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika volt orvosának és Dr. Mervát Abdel Rahman kandidátusnak, a Kairói Orvostudományi Egyetem munkatársának a közös kutatásokat. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Lemberkovics Évának, Dr. Balázs Andrea adjunktusnak, Dr. Then Mária tudományos főmunkatársnak, Dr. Czinner Erika Ph.D. és Dr. Fejes Szabolcs Ph.D. kollégáknak, a Semmelweis Egyetem Farmakognóziái Intézet munkatársainak a jókedvű közös munkákért. Köszönettel tartozom Dr. Verecke Andrásnak, az orvostudomány kandidátusának, a Semmelweis Egyetem I. Belgyógyászati Klinika adjunktusának, Dr. Somogyi Anikó docensnek, az orvostudomány kandidátusának és néhai Dr. Prónai László tudományos főmunkatársnak, az orvostudomány kandidátusának, barátaimnak, a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika munkatársainak a két évtizedes kollegialitásért, az eredményes közös kutatásokért. Köszönöm Dr. Rosta András kandidátusnak, az Országos Onkológiai Intézet főorvosának őszinte barátságát, segítőkészségét és tanácsait. Köszönet illeti Héthelyi Éva műszaki szakértőt, a Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar, Gyógy- és Aromanövények Tanszék munkatársát, Dr. Stefanovits-Bányai Éva Ph.D. docenst, a Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Kar, Alkalmazott Kémia Tanszék munkatársát, Dr. Bíró Lajost, az Országos Élelmezés-és Táplálkozástudományi Intézet orvosát, az analitikai munkák során nyújtott felbecsülhetetlen segítségért. Köszönöm Dr. Dinya Elek kandidátusnak, az eredmények matematikai statisztikai feldolgozásához adott szakmai tanácsait. Hálával tartozom Dr. Horváth Tündének, az orvostudomány kandidátusának, nyugalmazott főorvosnak, Dr. Kassai-Farkas Sándornak a Komárom-Esztergom Megyei Szent Borbála Kórház főorvosának, Dr. Abonyi Margitnak (Ph.D.), a Semmelweis Egyetem I. Belgyógyászati Klinika docensének, Dr. Lengyel Gabriella kandidátusnak, a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika adjunktusának a humán vizsgálatok megszervezésében nyújtott segítségért. Köszönöm Dr. Kovács Ágotának, a Péterfy S. utcai Kórház és Rendelőintézet főorvosának, az orvostudomány kandidátusának segítőkészségét, támogatását a humán vizsgálatok lebonyolításánál. Őszinte hálával gondolok néhai barátomra, Prof. Dr. Dworschák Ernőre, az Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet professzorára, aki tudásával, szakmai támogatásával segítette tudományos munkásságomat. Köszönöm Dr. Győry Hedvignek, a Szépművészeti Múzeum egyiptológusának az érdekesítő közös tanulmányokat, akivel több orvoslástörténeti cikk és könyv írásában dolgozhattam együtt. Őszintén köszönöm Prof. Dr. Tompa Annának, a Fodor József Országos Közegészségügyi Központ Országos Kémiai Biztonsági Intézete igazgatójának, hogy konzorciumi tagként meghívott Széchenyi Programjába, ezzel lehetővé tette, hogy kutatási eredményeim a gyakorlatban is hasznosíthatók legyenek. Köszönöm Dr. Péterfy Ferencnek, a Diagnosticum Rt. elnökének, Pallai Zsoltnak, a Diachem Kft. igazgatójának, hogy támogattak a Széchenyi Programban elvállalt feladatok végrehajtásában, és a projektek megvalósításában. Kurucz Tímea vegyész-mérnöknek, a Diachem fiatal munkatársának a színvonalas analitikai munkákért jár köszönet. Köszönöm Prof. Dr. Szilágyi Mihálynak, a Gödöllői Agrártudományi Egyetem nyugalmazott tanárának nagyvonalú támogatását, és a közös állatkísérleteket. Köszönöm Prof. Dr. Papp János intézetvezető egyetemi tanárnak, a Szent István Egyetem professzorának, hogy meghívott közös kutatások végzésére. Köszönettel tartozom Dr. Bertók Lórándnak, az OSSKI professzorának a dolgozat elkészítéséhez nyújtott értékes tanácsaiért.

Megtiszteltetésnek érzem, és köszönöm, hogy Prof. Dr. Köteles György, az Országos Frederic-Joliot-Curie Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet nyugalmazott főigazgatója 2004-ben meghívott a NKFP keretében végzett kutatásokhoz, ami rendkívüli segítséget jelent további munkáim szempontjából. Köszönöm Dr. Ágoston Mártának, Dr. Prechl Józsefnek és Dr. Szaleczky Erikának, volt Ph.D. munkatársaimnak és Herold Magdolna vegyészteknikusnak a közös kísérleteket. Köszönöm a Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság minden tagjának az évek során nyújtott segítséget, barátságot és bizalmat. Hálával és őszinte barátsággal köszönöm Bárkovits Saroltának, Pintér Edinának és Kaján Andreának, hogy kitartó szorgalommal, odaadással, fáradhatatlanul végezték a sokszor nagyon nehéz körülmények között megvalósuló kutatások laboratóriumi munkáit, részt vettek a Ph.D. képzés során a módszerek betanításában, távollétemben önállóan végezték a rájuk bízott nem könnyű feladatokat. A jó hangulat megteremtésében, a munkák gördülékenységében vannak kiemelkedő érdemeik. Köszönöm Preiner Vincénének a sok-sok laboratóriumi munkát, kedves figyelmességét. Köszönöm Tóth Imrénének és Burka Évának, a Semmelweis Egyetem Szövet-és Fejlődéstani Intézete munkatársainak technikai

segítségét a szövettani metszetek elkészítésénél. Köszönöm Gurzó Krisztina, a BME vegyésztechnikusa és Gonther Katalin a MTA Központi Fizikai Kutatóintézet vegyésztechnikusa analitikai munkákban nyújtott segítségét. Köszönöm a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika minden munkatársának, akik részt vettek a közös kutatásokban a sok segítséget, barátságot. Köszönet illeti hajdani munkatársaimat, Bacsó Gizellát, Jósfay Lórántnét, Nánay Ferencnét, akik az Arteriosclerosis Kutatócsoportban végzett munkám során dolgoztak velem. Külön köszönöm Kelemen Magdolnának az évtizedek alatt sem múló igaz barátságot, az önzetlen segítséget és a kiváló együttműködést. Köszönöm azoknak a munkatársaimnak is a segítséget, akik a dolgozat megírása után kapcsolódtak be kutatásaimba, Dr. Fébel Hélinek, az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet tudományos főmunkatársának, Dr. Dám Annamáriának az OSSKI főosztályvezetőjének és Dr. Kerényi Tibornak, Semmelweis Egyetem II. Patológiai Intézet professzorának a most induló kutatásokban való aktív részvételét.

Köszönöm az ETT, OTKA, NKFP, Richter Gedeon Rt, Májkutató Alapítvány, Egészséges Nemzetért Alapítvány és Falk Alapítvány, Nemzeti Egészségvédelmi Intézet, Parma Patika, Diagnosticum Rt. és a Diachem Kft. nagyvonalú támogatásait, melyek nélkül e munka nem valósulhatott volna meg.

Soha nem múló hálával és köszönettel tartozom családomnak, rokonaimnak az önzetlen támogatásért, szakmai tanácsaikért, a közös kutatásokért. Külön köszönöm néhai Prof. Dr. Zsinka Ágnesnek a sok éven át tartó szakmai támogatást, segítséget, Prof. Dr. Juhász-Nagy Sándor erkölcsi és szakmai támogatását, Dr. Kállay Béla docens állatkísérletekhez nyújtott önzetlen segítségét.

Végül kimondhatatlan hálával köszönöm meg szüleimnek és néhai nagyszüleimnek azt, hogy mindig mindenben számíthattam rájuk, mellettem álltak, biztattak, és fiamnak, akinek számítástechnikai és angol tudása rendkívüli segítség volt számomra.

1. Melléklet