

OPPONENSI VÉLEMÉNY

Hegedűs Attila: A csonthéjas gyümölcsök antioxidáns hatásában megnyilvánuló genetikai variabilitás jellemzése c. akadémiai doktori értekezéséről

Az értekezésben Hegedűs Attila sok éves szisztematikus kutatómunkájának eredményeit foglalta össze, amelyek középpontjában a csonthéjas gyümölcsök antioxidáns kapacitásának összehasonlítása, az ennek háttérében álló antioxidáns hatással rendelkező vegyületek azonosítása, továbbá az azok bioszintézisét befolyásoló genetikai és környezeti hatások felmérése állt. További célja volt olyan kiemelkedő antioxidáns kapacitással rendelkező ún. szupergyümölcsöt termő fajták, illetve genotípusok azonosítása, amelyek perspektivikusan felhasználhatók humán egészségvédelmi célokra akár preventív, akár a terápiát kiegészítő jelleggel.

A disszertációban leírtakkal kapcsolatban észrevételeimet és kérdéseimet a szövegben való előfordulás sorrendjében teszem meg.

1. Bevezetés

Ebben a fejezetben röviden összefoglalja a gyümölcsök antioxidáns hatásával kapcsolatosan eddig elért főbb eredményeket és vizsgálati célokat, különös tekintettel azok lehetséges szerepére a humán egészségvédelemben.

Az adott fejezettel kapcsolatban megjegyzésem és kérdésem nincs.

2. Irodalmi áttekintés

Ebben a fejezetben részletesen, monografikus alapossággal, tárgyalja a vizsgálatait megalapozó, az antioxidánsokkal és azok hatásaival kapcsolatban megjelent korábbi tudományos eredményeket, valamint bemutatja a vizsgálatainak tárgyát képező csonthéjas gyümölcsöket és azok jelenleg ismert fajtaváltozatainak kialakítását.

Az adott fejezetben leírtakkal kapcsolatban, ismereteim alapján elsődlegesen az antioxidánsokra koncentrálva, az alábbi megjegyzéseim és kérdéseim vannak.

2.3.1. alfejezet C-vitamin

A megadózisban adagolt aszkorbinsav tumor ellenes hatásával kapcsolatban leírtak ugyan helytállóak, egy fontos momentum azonban hiányzik, mégpedig az, hogy az aszkorbinsav hatása a tumor terápiában csak abban az esetben lehet eredményes, amennyiben azt

intravénásan adagolják, mivel csak ilyen módon érhető el lokálisan olyan folyamatosan magas aszkorbinsav szint, amely már bizonyítottan citotoxikus hatást fejt ki a kiemelkedően nagy metabolikus aktivitással rendelkező malignus sejtekre.

(González, M.J., Miranda-Massari, J.R., Mora, E.M. et al. (2002): *Orthomolecular oncology: a mechanistic view of intravenous ascorbate's chemotherapeutic activity*. P.R. Health Sci. J. 21:39-41.)

Ennek hátterében az a mechanizmus áll, amelyről egyébként a disszertáns is említést tesz, hogy a nagy dózisú extracelluláris aszkorbát tranziens fémek, elsősorban vas, jelenlétében hidrogén-peroxid képződést indukál, amely sejthalált eredményez.

(Frei, B., Lawson, S. (2008): *Vitamin C and cancer revisited*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:11037-11038.)

2.3.3. alfejezet E-vitamin

Az α -tokoferol oxidációja során képződő tokoferoxil gyökkel kapcsolatban célszerűnek tartottam volna utalni arra is, hogy az nagyon rövid életidejű és spontán gyorsan továbbalakul relatíve stabil tokoferil-kinonná.

A leírtakkal ellentétben viszont, mely szerint az α -tokoferol semlegesíti a szinglet oxigént, szeretnék utalni arra, hogy ismereteim szerint hatékonyan redukálja a szuperoxid aniont (O_2^-), a peroxi ($LOO\cdot$), hidroperoxi ($HO_2\cdot$) vagy hidroxil ($\cdot OH$) gyököket, ugyanakkor nem nyújt védelmet a szinglet oxigén (1O_2) hatásai ellen.

(Schafer, F.Q., Wang, H.P., Kelley, E.E. et al.(2002): *Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants*. Biol. Chem. 383: 671-681.)

2.5.1. alfejezet Őszibarack

Dalla Valle és munkatársai (2007) eredményeire hivatkozva leírja, hogy a vérplazma antioxidáns kapacitása 1-4 órával az elfogyasztás után csak mérsékelten növekedett. Úgy gondolom, hogy emberben 1-4 óra múlva jelentős változások nem is várhatók a felszívódási viszonyokat figyelembe véve, mivel a táplálékban lévő biológiailag aktív molekulák ennyi idő alatt még csak részben érhetik el a felszívódásra alkalmas bélszakaszokat, illetve növelhetik meg szignifikáns mértékben a szisztémás keringésben mérhető koncentrációt.

2.5.5. alfejezet Meggy

A meggy antioxidáns vegyületeinek tárgyalása során Burkhardt és munkatársai (2001) közlésére hivatkozva leírja, hogy annak egyik legjelentősebb antioxidáns vegyülete a melatonin. Ezzel kapcsolatban azt szeretném megkérdezni, hogy azonosították-e a melatonin

bioszintézisét katalizáló enzimeket növényekben is, és ha igen, azok azonosak-e az állati szervezetben, elsősorban az agy corpus pineale régiójában, valamint a bélcsatornában megtalálható enzimekkel?

3. Célkitűzés

Az adott fejezetben a disszertáns röviden, tömören és logikusan összefoglalja vizsgálatainak fő célkitűzéseit, amelyek alapján ismerteti az értekezés további fejezeteiben saját vizsgálatainak eredményeit.

Az adott fejezettel kapcsolatban megjegyzésem és kérdésem nincs.

4. Anyag és módszer

A kertészeti, ezen belül a gyümölcstermesztési, tudományterületen kevésbé jártas olvasó, jelen esetben az opponens, számára rendkívül hasznos volt, hogy az adott fejezetben ismerteti a vizsgálatait tárgyát képező növényanyagot, valamint a növényi antioxidáns kutatás során alkalmazott módszereket, amelyek nagyrészt ugyan megegyeznek az állati és humán mintákkal végzett vizsgálatok során alkalmazott módszerekkel, de bizonyos szükségszerű eltérésekkel. Az antioxidáns hatású vegyületek bioszintézisét katalizáló enzimeket kódoló gének azonosítására, a génexpresszió vizsgálatokra a kor követelményeinek megfelelő, adekvát molekuláris, illetve bioinformatikai módszereket alkalmazott.

Az adott fejezetben leírtakkal kapcsolatban az alábbi megjegyzéseim és kérdéseim vannak.

Az értekezés egy későbbi alfejezetében (5.1.5. A meggyfajták antioxidáns kapacitásának jellemzése), a 10. táblázatban, feltüntette a meggyfajták gyümölcseinek glükóz és fruktóz tartalmát is. Ezekre vonatkozóan azonban nem adott meg mérési módszert ebben a fejezetben.

A 4.20. alfejezetben - Bioinformatikai elemzés – csak részben fejt ki, hogy a bioinformatikai elemzés során milyen szintű homológiát tartott már elfogadhatónak?

5. Eredmények

Az adott fejezetben jól áttekinthető, informatív módon, de részletesen tárgyalja vizsgálatainak a disszertáció témája szempontjából legfontosabb eredményeit.

Az adott fejezetben leírtakkal kapcsolatban az alábbi megjegyzéseim és kérdéseim vannak.

5.1. alfejezet A csonthéjas gyümölcsök antioxidáns kapacitásának összehasonlítása

Az alfejezetben lévő 11. ábra feliratából nem derül ki, hogy az antioxidáns kapacitásnál melyik módszerrel kapott eredményeket tüntette fel. Az antioxidáns kapacitás érték megadásakor továbbá célszerű lett volna azt is jelezni, hogy az adott érték a gyümölcshús kivonatra, vagy annak szárazanyag tartalmára vonatkozik-e. Az eltérő szárazanyag tartalom ugyanis torzító hatású lehet az abszolút értékekre vonatkozóan. Az adott ábrán feltüntetett adatokból továbbá az sem derül ki, hogy az egyes csonthéjas gyümölcsfajok gyümölcseinek adatai milyen érési stádiumból származtak. Feltehető ugyanis, ez a későbbiekben egyébként részletesen is kifejtésre kerül, hogy az antioxidáns hatású vegyületek szintézisét katalizáló enzimeket kódoló gének expressziója, illetve ennek eredményeként az adott enzimfehérjék szintézise, az érés során változik, így az adott érési stádium a kapott eredményeket jelentős mértékben befolyásolhatja.

5.1.1. alfejezet Az őszibarackfajták antioxidáns kapacitásának jellemzése

Az adott alfejezetben leírtakkal kapcsolatban szeretnék utalni arra, hogy a dolgozat egy korábbi fejezetében leírta, hogy a sárga és fehér húsú őszibarack fajták esetében jelentős eltérés van a karotinoidokat bontó dioxigenáz enzim aktivitásában. Az viszont sem ott, sem ebben a fejezetben nem kerül tárgyalásra, hogy a dioxigenáz enzim hatására milyen vegyületek keletkeznek a karotinoidokból, illetve jelen alfejezettel összefüggésben, lehet-e ezeknek szerepe az antioxidáns kapacitásban?

5.1.5. alfejezet A meggyfajták antioxidáns kapacitásának jellemzése

A 11. táblázatban, amely az antioxidáns paraméterek és a monoszacharid tartalom közötti összefüggéseket mutatja be szoros, szignifikáns összefüggéseket mutatott ki a glükóz és a fruktóz tartalommal kapcsolatban, de ezekről nem esik szó a táblázathoz tartozó szöveges magyarázatban. Elismerem, hogy ez nem volt a dolgozat célkitűzése, de amennyiben ilyen adatokat közöl, akkor azokról, legalább röviden, mindenképpen szükséges lett volna említést tenni.

6. Eredmények megvitatása

Ebben a fejezetben részletesen tárgyalja vizsgálatainak eredményeit, ahol erre lehetősége volt a korábbi irodalmi adatokkal is összefüggésben. Meg kell azonban jegyeznem, hogy a fejezet címével ellentétben itt nem csupán a korábban már bemutatott vizsgálatok eredményeinek megvitatására kerül sor, hanem új, korábban nem ismertetett, vizsgálatok eredményeinek

bemutatására, majd megvitatására is sor kerül. A vizsgálatok egy része, így például a 6.6. alfejezetben leírt állatkísérletek, kapcsán további problémám, hogy az itt bemutatott kísérlet részletei, a mért paraméterek vizsgálati módszerei is csak részben, vagy egyáltalán nem kerültek ismertetésre az Anyag és módszer fejezetben.

6.1. alfejezet Az antioxidáns kapacitás fajok közötti és fajon belüli variabilitása

A polifenolok hatásaival kapcsolatban az alfejezet bevezetőjében a számos pozitív eredmény ismertetése mellett célszerűnek tartottam volna utalni arra is, hogy a polifenolok biológiai hatékonysága jelentős mértékben eltérő. Azok ugyanis hatásukat, felszívódásuk mértékétől függően, a bélcsatorna eltérő szakaszaiban fejtik ki, és csak részben a szervezetben. Utóbbi esetben fontos lett volna utalni arra is, hogy az egyes szövetek/szervek polifenol akkumulációs kapacitása is eltérő.

Han, X., Tao Shen, T., Hongxiang Lou, H. (2007): Dietary polyphenols and their biological significance. Int. J. Mol. Sci. 8, 950-988.

Surai, K.P., Surai, P.F., Speake, B.K. et al. (2004): Antioxidant-prooxidant balance in the intestine: Food for thought 2. Antioxidants. Curr. Topics Nutraceut. Res. 2: 27-46.

A flavonoidok antioxidáns hatása emellett jelentős mértékben függ a napi felvett mennyiségtől is, mert túlzottan nagy mennyiségű bevitel esetén már nem antioxidáns, hanem prooxidáns hatást mutatnak, amely például vegetáriánus étrend esetén akár veszélyforrás is lehet.

Skibola, C.F., Smith, M.T. (2000): Potential health impacts of excessive flavonoid intake. Free Radic.Biol. Med. 29:375-383.

A flavonoidok közé tartozó flavonolokkal kapcsolatban célszerűnek tartottam volna utalni arra is, hogy ezek egy része, az esetleges autoxidáció mértékétől függően, eukariota sejtekben genotoxikus hatású is lehet. Az autoxidáció elsősorban mérsékelten alkalikus pH értéken kifejezett, amely a vékonybélben általános, így ott ezzel feltétlenül számolni kell.

Silva, I.D., Gaspar, J., da Costa, G.G. et al. (2000) Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutical agents. Chem.-Biol. Interact. 124: 29- 51.

6.3. alfejezet Az antioxidáns kapacitást kialakító fő vegyületcsoportok azonosítása

A „Pipacs 1” meggyfajta genisztein tartalma nem csak „érdekes megfigyelés”, mivel annak jól ismert endokrin diszruptor hatása miatt, jelenléte nem feltétlenül kedvező humán egészségvédelmi szempontból.

6.4 alfejezet A Prunus fajok gyümölcsének flavonoid-bioszintézisben feltehetően szerepet játszó gének azonosítása

A flavonoid bioszintézisben feltehetően szerepet játszó enzimeket kódoló gének egyszeres vagy többszörös kópiaszáma megítélésem szerint rendkívül izgalmas, további kutatásokat indukáló, kérdéseket is felvet. Abban az esetben ugyanis, ha a paralóg kópiákban fellelhető szekvencia eltérések az adott gén kódoló régiójában fordulnak elő, és ehhez funkcionális eltérések is társulnak, azaz ha az egyes kópiák által kódolt enzim fehérjék katalitikus aktivitásában is eltérés van, akkor ez magyarázatul szolgálhat az egyes fajták közötti eltérésekre a flavonoid összetételben, illetve mennyiségben, végeredményben azok antioxidáns kapacitásában.

6.6. alfejezet A potenciális szupergyümölcsök várható fiziológiai hatásainak áttekintése és előzetes tesztelése állatkísérletekben

Az alfejezetben a kajszi zsíroltható antioxidáns vegyületei kapcsán utalás történik a β -karotin kedvezőtlen fiziológiai hatásáról is dohányos emberek számára. Ezzel kapcsolatban azt írja: „...a kísérletek csak az izolált formában (táplálék kiegészítőként) bevitt és nem a növényi táplálékkal elfogyasztott β -karotin káros hatását igazolták...”. A leírtakkal kapcsolatban az a problémám, hogy dohányosok esetében a β -karotin potenciálisan kedvezőtlen fiziológiás, egészen pontosan tumor képződést indukáló, hatása, véleményem szerint, nem elsősorban a beviteli forrással, hanem sokkal inkább a dózissal van összefüggésben. Jól ismert ugyanis, hogy a β -karotin magas oxigén tenzió mellett, így például a tüdő alveolusokban, nem antioxidáns, hanem prooxidáns hatású, így nagyobb koncentráció esetén a prooxidáns hatás is kifejezettebb lehet.

(Palozza, P., Luberto, C., Calviello, G. et al. (1997): Antioxidant and prooxidant role of beta-carotene in murine normal and tumour thymocytes: effects of oxygen partial pressure. Free Radic. Biol. Med. 22:1065-1073.)

Az alfejezetben a „szupergyümölcsök” nagyobb mennyiségű antioxidáns tartalmának bizonyos típusú tumorok elleni potenciálisan kedvező hatásával kapcsolatban leírtakkal kapcsolatban pedig szükségesnek tartom megjegyezni, hogy az antioxidáns hatású vegyületek tumor fejlődésre kifejtett hatásával kapcsolatban az újabb eredmények alapján azok kedvezőtlen hatása is ismert. Az antioxidánsok hatása részben ugyanis abban keresendő, hogy azokat bizonyos mennyiségben alkalmazva, befolyásolhatják a reaktív oxigén vegyületek által az Nrf2 transzkripció faktor által szabályozott antioxidáns gén klaszter expresszióját. Ilyen

módon viszont az antioxidánsok potenciálisan pro-karcinogének is lehetnek, mivel a reaktív oxigén gyökök csökkentik egyes onkogének hatását.

(DeNicola, G.M., Karreth, F.A., Humpton, T.J. et al.(2011): Oncogenic-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. Nature 475: 106-109.)

A genisztein jelen alfejezetben leírt kedvező tumor ellenes hatásaival kapcsolatban pedig arra szeretnék utalni, hogy annak kedvezőtlen hatását is leírták, mivel a vérésejteket, elsősorban a fehérvérésejteket, képző őssejtek DNS-ét károsítja. Ennek hatására abnormális mértékű fehérvérsejt képződés indulhat be, így potenciális kiváltó oka lehet például a gyermekkorban kialakuló leukémianak.

Azarova, A.M., Lin, R.K., Tsai, Y.C. et al.(2010).Genistein induces topoisomerase IIbeta- and proteasome-mediated DNA sequence rearrangements: Implications in infant leukemia. Biochem. Biophys. Res. Commun. 399: 66–71.

7. Kiemelt új tudományos eredmények

Az adott fejezetben leírt tudományos eredmények mindegyikét a Jelölt új tudományos eredményének fogadom el, mivel azokat az általa vezetett kutatócsoport elsőként írta le a szakirodalomban.

Véleményemet összefoglalva megállapítottam, hogy Hegedűs Attila a célkitűzésekben megfogalmazott céljait megvalósította, azaz olyan új tudományos eredményeket ért el, amelyek alapján a hazai termesztésű csonthéjas gyümölcsök antioxidáns kapacitása genetikai szelekciós módszerekkel célirányosan tovább növelhető, a szelekció során a disszertációban ismertetett molekuláris genetikai módszerek is felhasználhatók, így annak hatékonysága jelentős mértékben növelhető. Ennek ismeretében az általa szintén célként megfogalmazott olyan ún. szupergyümölcsök javasolhatók a humán táplálkoástudomány számára, amelyek a fogyasztók antioxidáns ellátottságát természetes módon növelheti.

A disszertációt a fentiek alapján nyilvános vitára bocsátásra alkalmasnak tartom és sikeres védést követően javaslom Hegedűs Attila részére az MTA doktora tudományos cím odaítélését.

Gödöllő, 2013. december 16.

Mézes Miklós
az MTA levelező tagja