

A redox-homeosztázis és a redox-asszociált rendszerek kapcsolata gasztrointesztinális betegségekben

Doktori tézisek

Dr. Kleiner Dénes

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Blázovics Anna, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Mák Erzsébet, Ph.D., főiskolai adjunktus
Dr. Lantos János, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Demeterné Dr. Tekes Kornélia, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Vereckei András, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Szöllősiné Varga Ilona, C.Sc., ny. egyetemi docens

Budapest
2017

1. Bevezetés

Napjainkban egyre ismertebbé válik a redox-homeosztázis jelentősége az élettani folyamatokban, a különböző kórképekben. A nyugati társadalmakban legnagyobb mortalitással rendelkező kardiovaszkuláris és daganatos megbetegedésekben ugyanúgy megfigyelhető az oxidatív stressz, mint a terminális oxidációban vagy az immunrendszer működése közben. A daganatos kórképekben kiemelten fontos a redox-homeosztázis és az azt érintő anyagcsere-folyamatok vizsgálata, különösen az alkalmazott kemo- és sugárterápia alatt, a metasztázisok megelőzésében, vagy minél későbbi megjelenésében.

Mindezek ellenére nem jellemző az oxidatív stressz direkt vizsgálata a klinikai orvosi tevékenység során. Ennek számos oka között kiemelhető, hogy jelenleg nincsenek nemzetközileg elismert sztenderdek a mérésekkel kapcsolatban, sőt - figyelembe véve a redukciós és oxidációs folyamatok szubcelluláris szintű koordináltságát - vitás, hogy az egyik szövetben mért érték jellemzi-e a másik szövet redox-státuszát.

Az azonban, hogy egyre több tanulmány lát napvilágot mind az antioxidánsokról, mind a redox-homeosztázis betegségek során megfigyelhető változásáról, felveti a kérdést: valóban elhanyagolható-e a vizsgálata a klinikai tevékenység során? Munkacsoportunk az elmúlt években, évtizedekben számos, a szabad gyököket és antioxidánsokat érintő megfigyelést tett, melyek „nagyműszerek” (elektronspin-rezonancia, impulzus radiolízis) használatán túl viszonylag egyszerű technikai háttérrel is megoldhatóak voltak. Mindez rávilágít arra, hogy a redox-homeosztázis kutatása nemcsak nem elhanyagolható, hanem folytonos és egyre szerteágazóbb vizsgálatokat igényel, hogy klinikai szempontból is releváns válaszokat adjon a betegségek elkerülése, diagnosztizálása és terápiája során. Továbbá értékesnek mutatkozik az antioxidáns-szabadgyök rendszerrel szorosan asszociált biokémiai folyamatok feltérképezése is, mint a különböző elemek szintje, vagy a transzmetilezés (a kötött formaldehid (HCHO)-szintek meghatározása), melyek pontosabbá teszik a mért redox-homeosztázist jellemző paraméterekből nyerhető információkat.

2. Célkitűzés

Kutatásunk célja a redox-homeosztázis és a transzmetilezés kapcsolatának felderítése volt, mivel az irodalmi adatok abba az irányba mutattak, hogy a szabadgyökös reakciók, a táplálkozási faktorok és a szervezet metiláltsági szintje között szoros kapcsolat létezik.

Előtanulmányaink során arra voltunk kíváncsiak, hogy a táplálkozási lánc különböző szintjein az élő szervezetek redox-rendszerei és transzmetilezési folyamatai milyen különbségeket mutatnak táplálkozás-egészségügyi szempontból.

Ennek megfelelően a mindennapos táplálkozásban jelentős, és bioaktív hatóanyagokban gazdag növények, a búza (*Triticum aestivum* L.), bab (*Phaseolus vulgaris* L.), cékla (*Beta*

vulgaris L. var. *rubra*), a káposzta (*Brassica oleracea* L.) és az állati eredetű élelmi alapanyagok, a baromfi- (*Gallus gallus domesticus* L.), illetve nyúlmáj (*Oryctolagus cuniculus* var. *domestica*) redox-paramétereit és könnyen mobilizálható metilcsoportjainak mennyiségét kívántuk meghatározni, és összefüggéseket keresni a redox-paraméterek és a metiláltsági szintek között.

Ezzel párhuzamosan a feldolgozott élelmiszerekben, kivonatokban (fürtös (*Vaccinium corymbosum* L.), a fekete (*Vaccinium myrtillus* L.) és a vörös áfonya (*Vaccinium vitis-idaea* L.) vizes kivonatai, fekete áfonya (*Vaccinium myrtillum* L.), ananász (*Ananas comosus* L.), fekete ribizli (*Ribes nigrum* L.) és meggy (*Cerasus vulgaris* Mill.) kivonatát tartalmazó keménycukor készítmények, valamint 100 %-os narancslevek és a kézzel facsart narancsok (*Citrus sinensis* L.) levében is vizsgáltuk az antioxidáns paramétereket és egyéb bioaktív anyagok jelenlétét.

Kísérletes kutatásokat végeztünk annak eldöntésére, hogy bizonyos táplálkozási faktorok milyen módon befolyásolhatják a redox-homeosztázist, valamint az azzal kapcsolatban álló rendszereket. Patkánykísérletekkel a tumorizikóval járó obezitást és alkoholizmust kívántuk modellezni. Arra is kíváncsiak voltunk, hogy alkalmas-e a liposzómális glicirrizin-kezelés az alkohol okozta károsodás kivédésére.

Humán tanulmányok eredményessége céljából a transzmetilezési folyamatok vizsgálatára (a kötött HCHO mérésére) rutinlaboratóriumi használatra is alkalmas nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszert dolgoztunk ki. Tanulmányainkban a kolorektális tumorok során tapasztalt redoxi és azzal asszociált metilezettség eltéréseit kívántuk elemezni. Munkánk során felfigyeltünk arra, hogy a kemoterápiát kapó betegek között gyakran kialakul a demenciához hasonló „chemobrain”. Mivel korábbi kutatások során több tumoros beteg esetében fémion-vizsgálatok is történtek a redox-homeosztázis vizsgálata során, retrospektív tanulmányunkban arra kerestük a választ, vajon e jelenséghez hozzájárulhat-e a fémion-háztartás zavara.

3. Módszerek

3.1. Növényi eredetű minták előkészítése

A liofolizált áfonyamintákat vizes hígítást követően (1 g/10ml) koncentrációjúra állítottuk be, és a heterodiszperz rendszert Whatman redős szűrőpapíron keresztül megszürtük, majd vízzel hígítási sort készítettünk.

Narancsmintákkal végzett kísérleteinkhez kereskedelmi forgalomban kapható „Salustiana”, „Navel” és „Lane late” narancsfajtákat (*Citrus sinensis* L.) és kereskedelemben kapható 100 %-os narancslevek (Cappy 100 %; Happy Day; Rauch 100 %; Sió 100 %; Spar Orange 100 %; Topjoy 100 %) használtunk.

A fekete áfonya- (*Vaccinium myrtillum* L.), ananász- (*Ananas comosus* L.), fekete ribizli- (*Ribes nigrum* L.) és meggytartalmú (*Cerasus vulgaris* Mill.) keménycukrokból vízzel 10 g/100ml koncentrációjú oldatokat készítettünk.

3.2. Állatkísérletek

Az állatkísérleteket a 40/2013. (II.14.) rendelet (az 1998. évi XXVIII. törvény módosítása) betartása mellett végeztük. Engedélyszám a patkánykísérletekhez: 770/004/04; XIV-I-001/229-4/2012; brojlerekísérlethez: 22.1/613/001/2010; nyúlakísérlethez: 22.1/5/003/2010. Az állatok eutanáziája a Kormány 40/2013 (II. 14.) Kormányrendelete az állatkísérletekről 4. mellékletben ("Az állatok leölésének módszerei") megadottak szerint történtek.

3.2.1. Vizsgálatok fogyasztásra szánt állatokban

Kereskedelmi forgalomban levő „beféjező” broilertápot kapó 6 brojlercsirkét (Babadi Baromfifeltető Kft., Ócsa, Magyarország), a 42. napon CO₂-os kábítást követően termináltuk. A májakat a kivéreztetés után izotóniás NaCl oldattal mostuk, Potter-Elvehjem készülékkel homogenizáltuk, majd -20 °C-on tároltuk a mérésekig. A standardizálást Lowry és mtsai (1951) szerint mért fehérjetartalom alapján végeztük, mintáinkat bovine szérumalbuminra nézve 10 mg/ml koncentrációjúra hígítottuk izotóniás NaCl oldattal.

Kereskedelmi forgalomban kapható nyúltápot fogyasztó 6 baknyulat (Lab-Nyúl Kft., Gödöllő, Magyarország) vizsgáltunk. A nyulakat 4 hónaposan T61 injekcióval termináltuk (2 ml/nyúl i.p.; Intervet International B.V. Boxmeer, Hollandia). A májakat az előző bekezdésben leírtak szerint kivérezítettük, mostuk, homogenizáltuk, majd -20 °C tároltuk és mérések előtt bovine szérum albuminra standardizáltuk.

3.2.2. Patkánykísérletek

Patkánykísérleteinkkel olyan modellrendszereket próbáltunk kialakítani, melyek tükrözik a társadalmi szokásokat, így releváns információkkal szolgálnak a nyugati társadalmakat érintő problémákról.

A zsírdús étrenddel végzett vizsgálatainkhoz hím Wistar patkányokat (200-250 g) használtunk (Biofarm Prompt Kft., Gödöllő, Magyarország). A kontrollcsoport (N = 5) csak standard patkánytápot fogyasztott. A zsírdús diéta az egyik csoport (N = 5) esetén 2 % koleszterint, 20 % Venus étolajat (kereskedelmi forgalomból) és 0,5 % kólsavat, a másik csoport esetén (N = 5) 1 % koleszterint, 0,3 % kólsavat és 11 % napraforgóolajat tartalmazott a kontrolltápra keverve. A 10. napon a terminálást mély narkózisban (75 mg/ttkg ketamin (Calypsol 50 mg/ml oldat), 7,5 mg/ttkg xilazin (Rompun 20 mg/ml oldat)) a hasi vénán keresztül történő exsanguinatioval végeztük. A májakat a fogyasztásra szánt állatoknál leírtak szerint kezeltük.

Hím Harlan-Wistar (Toxicoop, Magyarország) patkányokat használtunk az alkoholos eredetű zsírmáj tanulmányozásához (kezdő tömeg: 175-200 g). A konvencionálisan tartott állatok

közül 7-7 állat akklimatizációt követően 4 naponta emelkedő alkoholmennyiséget kapott (1, 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14 %) vizes alkoholos oldat formájában az itatóvizében *ad libitum*. Ezt követően 8 héten keresztül 14 % alkoholt tartalmazó ivóvizet fogyasztottak, majd az utolsó 4 hétben az alkohol mennyiségét 20 %-ra emeltük. Az alkoholt fogyasztó patkányok egyik fele (N = 7) heti kétszer 156 µl/0,1tkg mennyiségű, liposzómális glicirrizint kapott (5 mg glicirrizin/ml), amíg az alkoholt fogyasztó patkányok másik fele (N = 7) intravénásan csak izotóniás NaCl oldatot kapott az azonos napokon. A kontrollcsoport (N = 5) állatait hasonló módon tartottuk, mint a kezelteteket, de semmilyen egyéb kezelést nem kaptak. A 16. héten izoflurán anesztézia mellett (4 %-os izoflurán O₂-ben eloszlatva) termináltuk az állatokat. A *lobus sinister lateralist* a fogyasztásra szánt állatoknál leírtak szerint kezeltük.

3.3. Humán tanulmányok

A humán tanulmányokat az etikai szempontokat figyelembe véve végeztük. A vizsgálatok végzéséhez az alábbi engedélyekkel rendelkezünk: TUKEB 167/1997, TUKEB 15/2004, IKEB 3944/2004, TUKEB 133/2015.

A redox-rendszer tanulmányozásához használt humán plazmaminták előállításához a vérmintákat citrátot tartalmazó csövekbe gyűjtöttük. Centrifugálást követően (4 °C; 3000 rpm, 10 perc) a plazmákat külön kémcsövekbe gyűjtöttük. A plazmamintákat ismét centrifugáltuk, a felülúszót kémcsőbe gyűjtöttük és feldolgozásig -20 °C-on tároltuk. A lecentrifugált vérminták eritrocita-frakciójáról a „buffy coat”-ot eltávolítottuk, majd izotóniás sóoldattal mostuk. A standardizálást hemoglobintartalom alapján végeztük, melyet standard metodika szerint, CHR hemoglobin D-oldattal határoztunk meg. A vizsgálatokig mintáinkat -20 °C-on tároltuk.

3.4. Minták elemzése

A növényi eredetű mintákban a VII. Magyar Gyógyszerkönyv (1986) alapján határoztuk meg az aszkorbinsav mennyiségét. A teljes polifenoltartalmat a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (2003) alapján mértük meg, és a koncentrációt galluszsav egységben fejeztük ki (1 GAE = 1 mg galluszsav 1 ml HPLC-minőségű vízben).

A H-donor-aktivitást (Hatano és mtsai 1988) módszere alapján DPPH stabil gyök segítségével, spektrofotometriás módszerrel mértük. A szabad szulfhidril-csoportok koncentrációját Ellman és Lysko módszere alapján (1967), DTNB reagenssel határoztuk meg. A redukálóképességet spektrofotometriás módszerrel vizsgáltuk, Oyaizu szerint (1986). Az indukálható lipidperoxidáció gátlását Horváth és mtsai (1993) alapján, tiobarbitúrsavas reakciót követően mértük. A szabadgyökfogó kapacitást Blázovics és mtsai (1999) alapján, luminometriás eljárással vizsgáltuk.

A transzmetilezést növényi és állati minták esetén a kötött HCHO dimedonos reakciójának detektálásával magasnyomású vékonyréteg-kromatográfiával (OPLC) követtük. Az eritrocitamintákból történő transzmetilező kapacitás tanulmányunkhoz egy nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszert fejlesztettünk ki és validáltunk.

Az elemek meghatározását induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometriával (ICP-OES) végeztük eritrocitaminták esetén.

A hematológiai paraméterek meghatározásához Advia 120 vagy ABX Micros 60 hematológiai analizátort használtunk. A szérum paramétereket a Roche által gyártott kitekkel, standard módon határoztuk meg. A HbA1c-t Variant II HPLC rendszerrel vizsgáltuk. A CEA, CA 19-9, valamint az AFP tumormarkereket LIA-mAT immunoluminometriai kitekkel határoztuk meg.

A redukált NADH dinátrium és a redukált NADPH tetra(ciklohexil-amin) sókat HPLC-minőségű vízben oldva hígítási sort készítettünk. A továbbiakban Hatano és mtasi (1988) szerint vizsgáltuk a H-donor aktivitást.

Hisztológiai elemzéshez a mintákat neutralizált 4%-os formalinban fixáltuk, paraffinba ágyaztuk és hematoxilín-eozinnal történő festést követően fénymikroszkóppal elemeztük.

3.5. Statisztikai értékelés

Eredményeink értékeléséhez Statistica 11, Statistica 12 (StatSoft Inc., Tulsa, USA.) valamint Microsoft Office Excel 2003 és 2013 (Microsoft Corp., Redmond, USA.) programokat használtunk. A szignifikanciaszint 5 % volt, kivétel ez alól a retrospektív tanulmány, ahol a nagy mennyiségű statisztikai vizsgálat használata megkövetelte az 1 %-os szignifikanciaszintet.

4. Eredmények

4.1. Növényi eredetű minták részleges fitokémiai elemzése

Az élelmiszer eredetű antioxidánsok kontrollálatlan bevitele a "rebound" effektus miatt már károsná válhat. Ezért fontosnak tartjuk annak ismeretét, hogy az eredeti forrásként szolgáló növények és a feldolgozott termékek között milyen különbségek mutathatók ki. Ennek megfelelően olyan terméket vizsgáltunk, amelyek gyakori fogyasztási cikknek számítanak hazánkban is.

A kereskedelmi forgalomban kapható három narancsfajtából (Salustiana; Navel; Lane Late) facsart narancslevek és 5 féle 100 %-os narancslé (Cappy 100 %; Happy Day, Rauch 100 %, Sió 100 %, Spar Orange 100 %, Topjoy 100 %) redox-paramétereit vizsgálva csak az aszkorbinsavtartalomban tapasztaltunk szignifikáns eltérést. Azonban az is látható volt, hogy már a legkisebb aszkorbinsavtartalmú narancslevek esetén is az OGYÉI által meghatározott napi ajánlott beviteli érték jelentős részét 1 pohár (250 ml) narancslé képes fedezni.

Az áztatással készült áfonyaminták között a fekete áfonya kivonatokban mértük a legmagasabb polifenol- és aszkorbinsavtartalmat, redukálóképességet és indukálható lipidperoxidáció-gátlást.

Az ananász, áfonya, fekete ribizli és meggy koncentrátumot tartalmazó keménycukrok oldását követően vizsgáltuk a polifenoltartalmat, a H-donor aktivitást és a szabadgyök-fogó kapacitást. A gyümölcsstartalmú keménycukorban mérhető antioxidáns-paraméterek jelentősnek mutatkoztak.

A növényi eredetű minták közül meghatároztunk több, népelelmezésben fontos növény (búza, bab, cékla, káposzta) transzmetilező kapacitását. Jelentős különbségeket tapasztaltunk a minták között. Ezekre az eltérésekre mind az agrotechnikai körülmények, mind a fajták közötti különbségek hatással vannak.

4.2. Metil-pool vizsgálata fogyasztásra szánt állatok májmintáiban

Folytatva növényi eredetű mintáinkban elkezdett méréseinket, megvizsgáltuk emberi fogyasztásra szánt állatok esetében is az antioxidáns tulajdonságokat jellemző H-donor aktivitást és a transzmetilező kapacitást. Megállapítottuk, hogy a gyakrabban fogyasztott baromfímáj jelentősebb metil-poolal és H-donor aktivitással rendelkezik, mint a nyúlmáj.

4.3. Patkánykísérletek: Transzmetilezési folyamatok változása zsírdús táp határása és alkoholfogyasztás hatására

Patkánykísérletünkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a zsírdús, energiadús étrend hatására elzsírosodó májban milyen mértékben változik a metil-pool, tekintettel a nyugati étrend káros tulajdonságaira. Megfigyelhető volt, hogy a redox homeosztázist jellemző H-donor aktivitás csak kismértékben változott ($p = 0,166$). Mérsékelt zsírdús étrend esetében enyhe emelkedést figyeltünk meg a kontrollértékekhez viszonyítva, míg zsírdús étrend esetén kismértékű, statisztikailag nem szignifikáns csökkenést tapasztaltunk. Az enyhe emelkedés mögött feltételezhető volt a NADH, illetve NADPH kofaktorok szerepe. A két vegyület H donáló szerepét azonos mérési körülmények között elvégzett vizsgálatban igazoltuk ($r^2(\text{NADH}) = 0,988$; $p(\text{NADH}) < 0,001$; $r^2(\text{NADPH}) = 0,999$; $p(\text{NADPH}) < 0,001$). A kötött HCHO-szint zsírmájban szignifikánsan csökkent ($p_{\text{HCHO}} = 0,0002$). A post hoc vizsgálat során bizonyítottuk, hogy mind az enyhén zsírdús, mind a zsírdús táp hatására szignifikánsan kevesebb könnyen mobilizálható metilcsoport volt mérhető ($p_{\text{kontroll/enyhe zsírmáj}} = 0,004$; $p_{\text{enyhe/súlyos zsírmáj}} = 0,029$).

További vizsgálatunkban az alkoholfogyasztást és a liposzomális glicirrizinkezelést vizsgáltuk. Elvégeztük a glicirrizinnel kezelt és kezeletlen alkoholt fogyasztó állatok májmintáinak hisztológiai vizsgálatát, mikroszkópos képeken csak mérsékelt javulást lehetett érzékelni ($p = 1,00$).

A H-donor aktivitás a májmintákban mérsékelt emelkedést mutatott, ami feltételezhetően az alkohol lebontásából származó redukáló kofaktor többlet miatt alakult ki, mely bizonyítottan H-donor aktivitással rendelkezik, azonban a változás nem volt szignifikáns ($p = 0,415$). Emellett az alkohollal történő kezelés mérsékelt a szabad szulhidrilszintet ($p = 0,355$) és szignifikánsan csökkentette a kötött HCHO-szintet ($p = 0,002$; $p_{AK/Kontroll} = 0,001$). A glicirrizin-kezelés a kontrollértékek felé tendenciózus változásokat eredményezett minden esetben, a kötött HCHO-szint ennek köszönhetően statisztikailag már nem tért el a kontrolltól ($p_{ALGK/Kontroll} = 0,072$).

4.4. Kötött HCHO-szint meghatározása humán mintákban

A humán minták rutinszerű meghatározása OPLC-vel csak limitáltan oldható meg, a műszer nehéz beszerezhetősége miatt, ezért a már jól bevált módszert adaptáltuk egy, a klinikumban is könnyebben elérhető HPLC-rendszerre. A rendszer JASCO (Tokió, Japán) PU-980 pumpából, LG-980-02 szolvens keverőből, PU-975 diódasoros detektorból és ERC-3113 gázmentesítőből állt. Az elválasztáshoz Kinetex C18 (250x4,6 mm; szemcseméret: 5 μ m) kolonnát használtunk (Phenomenex, Torrance, USA.). Az A eluens HPLC minőségű vízzel készült 0,2 %-os ecetsavas oldat, a B eluens HPLC minőségű metanol volt. Izokratikus körülmények között dolgoztunk, a mozgó fázis 20/80 arányban tartalmazta A/B eluenseket. Az áramlási sebesség 0,7 ml/perc volt. Az injektált mennyiség 20 μ l volt. Detektálás 260 nm-en történt.

A 0,4 ml eritrocitamintát (5,0 g/100 ml hemoglobin), vagy HCHO-mintát (0,583; 1,167; 2,042; 2,917; 4,025 mg/100 ml HCHO) 1 ml HPLC-minőségű metanollal elegyítettük, majd 0,1 ml 0,07 % metanolban oldott dimedon oldatot adtunk hozzá. Szobahőmérsékleten történő (24 °C) tárolást követően (6 nap) a mintákat centrifugáltuk (2800 rpm, 4 °C; 10 perc), és az aliquot részt 0,2 μ m pórusméretű Phenex RC membránszűrővel szűrtük (Phenomenex Inc.; Torrance, CA, USA).

A validálás az ICH [International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (Műszaki Követelmények Harmonizációs Nemzetközi Tanácsa az Emberi Felhasználásra Szánt Gyógyszerekhez)] Q2(R1) irányelvei és a FDA [Food and Drug Administration (Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelet)] irányelvei szerint történt (ICH; FDA).

A metodika alkalmas az eritrocitamintákban mérhető kötött HCHO-szintek meghatározására. A válaszjel és a formaldemeton-koncentráció között lineáris kapcsolat állt fenn a HCHO oldat 0,583-4,025 mg/100ml koncentrációtartományában, ez a tartomány azonban szükség szerint kiterjeszhető. A standard egyenes determinációs koefficiense (r^2) nagyobb volt 0,99-nél.

A napok közötti és az egy napon belüli pontosság és torzítatlanság vizsgálata alapján az eredmények reprodukálhatók és megfelelően pontosak. Stabilitási és specificitási vizsgálataink szintén alátámasztották a módszer alkalmasságát.

4.5. Humán tanulmányok

Humán tanulmányunkban arra a kérdésre kerestünk választ, hogy milyen kapcsolat van a redox-homeosztázis, a transzmetilezés és fémelemszintek között, hogyan változnak a vizsgált paraméterek egymáshoz viszonyítva a tumor miatt kezelt betegekben.

Tanulmányunkban 25, a Semmelweis Egyetem Onkológiai Központjában megjelent kaukázusi rasszhoz tartozó egyén adatait használtuk fel. A kolektomizált betegeket (N = 12; átlag életkor \pm szórás = $59,8 \pm 11,2$) a vizsgálatot megelőző 8 hónapon belül operálták. A korban illesztett kontrollcsoport 13 fő volt (átlag életkor \pm szórás = $50,8 \pm 11,7$). A kolorektális tumor miatt műtött betegek és a kontrollcsoport között nem volt szignifikáns különbség a legtöbb rutinlaboratóriumi paraméterben. Az átlagos vörösvérsejttérfogat, százalékos limfocita arány, százalékos monocita arány ($p < 0,05$) esetén statisztikailag szignifikáns módon eltért a két csoport. Emellett a limfocitaszám a tumoros betegekben kisebb volt, a granulocitaszám viszont nagyobb értékeket mutatott. Szignifikánsan magasabb volt a vérlemezkeszám, amíg az átlagos vérlemezketérfogat nem szignifikáns módon kisebb volt a tumoros betegekben.

A redox-homeosztázisban megfigyelhető javuló értékek és a transzmetilező kapacitásban bekövetkezett nem szignifikáns emelkedés további kérdéseket vetett fel. A nem várt eredmények miatti anomália feloldására rövid, jegyzőkönyvben rögzített interjúban felmértük a kolektomizáltak étkezési szokásaiban bekövetkezett változásokat.

A vizsgált csoportban a betegek 58%-a változtatta meg étrendjét minimum 1 hónappal az első kemoterápiás kezelést megelőzően, további 83%-a változtatta meg az étrendjét legkésőbb az első kemoterápiás kezelés napján. Általában gyümölcsökben, zöldségekben gazdagabb étrendet kezdtek fogyasztani és jellemzővé vált a heti egyszeri vagy többszöri cékla fogyasztás. Ezek a változtatások a redox-homeosztázist és a transzmetilező kapacitást egyaránt befolyásolhatják, javíthatják. Figyelembe véve, hogy a mintavétel rögtön az első kemoterápiás kezelés előtt történt, alátámasztható az étkezés és az étrendváltoztatás kimagasló szerepe a redox-homeosztázisban és a transzmetilezésben.

A redox-homeosztázisban és a transzmetilezésben tapasztalt javuló vagy stagnáló értékek felvetik a kérdést, vajon a redox-homeosztázissal szoros kapcsolatban álló fém és nem fém elemsszintek miképp változnak kolektomizált betegekben. Retrospektív tanulmányunkban 49 kaukázusi rasszhoz tartozó beteg adatait elemeztük. A kolektomizált, tumoros betegeket (N = 27; átlag életkor \pm szórás = $63,9 \pm 8,0$) a vizsgálatokat megelőző 3

éven belül operálták. A járóbeteg csoportba belgyógyászati rendelésen megjelent betegeket válogattunk be ($N = 22$; átlag életkor \pm szórás = $46,8 \pm 13,8$). Kizáró tényező volt a kolorektális malignitás és a gyulladásos bélbetegség. Az elemek szintjének vizsgálata során 10 panaszmentes önkéntest (kontroll) is bevontunk a tanulmányba (átlag életkor \pm szórás = $55,3 \pm 14,9$).

Az elemek szintjét a mosott eritrocitákban vizsgáltuk, figyelembe véve, hogy az eritrociták élettartama meghaladja a 3 hónapot, így hosszabb periódust képesek jellemezni, mint a viszonylag változékony vérplazma (vagy szérum). Kiemelendő, hogy redox-asszociált Cu, Fe és Zn eritrocitákban mérhető legnagyobb átlagos értékei a kolektomizált betegek esetében volt megfigyelhető, sőt, az Al-szint is a kolektomizált betegekben volt a legmagasabb. Szignifikáns különbséget Al-koncentrációk esetén a kolektomizált betegek és a kontrollok között tapasztaltunk ($p < 0,01$).

A rutinlaboratóriumi paraméterek tekintetében a betegcsoportok között igen kevés jelentős eltérés volt megfigyelhető és általánosságban a mért adatok a normáltartományon belül voltak. Kivételt képezett az átlagos vörösvérsejt hemoglobinkoncentráció, a vörösvértestek eloszlási szélesség és az alkalikus foszfátáz értéke. Nem volt szignifikáns különbség a tumor-markerek tekintetében sem, és mind a kolorektális tumor miatt kezelt betegeknél, mind a járóbetegeknél jórészt a normáltartományon belül változtak az értékek.

Összességében tehát a fémelemszintek markáns változásai már a rutinlaboratóriumi paraméterek enyhe eltérései mellett is megfigyelhetőek voltak. Az elemek koncentrációinak változása azonban nemcsak csökkenés lehet, ahogy az a redox-asszociált Fe, valamint az Al esetében is megfigyelhető volt, sőt, a változás egyaránt feltételezhető pozitív és negatív eseményeket a háttérben. Az előzőekben tapasztalt javuló antioxidáns-értékek háttérében szintén feltételezhető egy emelkedett fémelemszint, amit lehetséges, hogy egy „egészségesebb”, nyomelemekben dúsabb étrenddel érhetett el a beteg, ahogy a tumor-asszociált kórképek esetében is feltételezhető ezeknek a változása. E megfigyelések alapján jelenleg is folynak vizsgálatok a táplálkozási faktorok hatásának tisztázására.

7. Tézisek

1. A redox-homeosztázis, a transzmetiláló képesség, valamint a fémion-háztartás között szoros kapcsolat mutatható ki.
2. Táplálkozás-élettani szempontból jelentős növényi és állati mintákban szignifikáns különbségek mutathatók ki a transzmetilezettség, fémion összetétel és a redox paraméterekben.

3. Patkánykísérletben igazolható, hogy az alkohol következtében kialakuló zsírmájban is szignifikánsan csökken a mobilizálható metilcsoportok szintje.
4. Patkánykísérletben, alimentáris eredetű zsírmájban a vizsgált globális antioxidáns paraméter (H-donáló képesség) sem enyhe, sem súlyos állapotban nem mutat szignifikáns különbséget az egészséges állatokhoz képest, amíg a könnyen mobilizálható metilcsoportszintekben már szignifikáns csökkenés mérhető a máj elzsírosodási folyamatában.
5. Retrospektív vizsgálatban igazolható, hogy kolektomizált és kemoterápiában részesülő betegek fémion-homeosztázisa több fém esetében jelentős különbséget mutat az egészséges egyének értékeihez viszonyítva.
6. A kolektomizált és kemoterápiában részesülő betegek szignifikánsan magasabb eritrocita aluminiumszintje szerepet kaphat a tumorokhoz köthető oxidatív stresszel járó neurológiai kórképek, pl.: „chemobrain” kialakulásában.
7. Humán eritrocitákban a transzmetilációs folyamatok tanulmányozására HPLC módszert fejlesztettünk ki, mellyel lehetőség nyílik a betegség státuszának követésére, képet kaphatunk tápláltsági állapotuk változásáról, étrend-kiegészítő fogyasztási szokásaikról.

8. Saját publikációk jegyzéke

8.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. Blázovics A, Kursinszki L, Papp N, Kleiner D, Szőke É, Hegyi G, Szilvás Á. (2016) Is professional prescribing of a commercially derived dietary supplement in colectomised patients necessary? *Eur J Integr Med*, 3: 219-226. [IF (2015).: 0,769]
2. Czigány Z, Turóczy Zs, Kleiner D, Lotz G, Homeyer A, Harsányi L, Szijártó A. (2015) Neural elements behind the hepatoprotection of remote perconditioning. *J Surg Res*, 193: 642-651. [IF (2015).: 2,198]
3. Ditrói K, **Kleiner D**, Böszörményi A, Szentmihályi K, Fébel H. (2013) The alimentary impact of the hemp seed. *Acta Aliment*, 42: 410-416. [IF (2013).: 0,427]
4. **Kleiner D**. Szelénpótlás; növényi eredetű táplálékaink szeléntartalma. In.: Blázovics A. Mézes M. (Szerk) Természetes eredetű hatóanyagok a modern orvoslásban 2013. Szent István Egyetemi Kiadó Nonprofit Kft. Gödöllő. 2014: 112-116.
5. **Kleiner D**. Alkoholos májkárosodás és transzmetilezés. In: Blázovics A. Róth E. Mézes M. (szerk.), Oxidatív stressz és betegségek. Szent István Egyetemi Kiadó Nonprofit Kft. Gödöllő. 2015: 141-147.
6. **Kleiner D**, Bersényi A, Fébel H, Hegedűs V, Mátis E, Sárdi E. (2013) Transzmetilezési folyamatok és a redox homeosztázis. *Orv Hetil*, 154: 1180-1187.
7. **Kleiner D**, Ditrói K. (2012) A kannabidiol gyógyászati alkalmazhatósága metabolikus szindrómában. *Orv Hetil*, 153: 499-504.
8. **Kleiner D**, Hegyi G, Urbanics R, Dézsi L, Robotka H, Fehér E, Sárdi É, Szébeni J, Blázovics A. (2016a) Hepatoprotective liposomal glycyrrhizin in alcoholic liver injury. *Eur J Integr Med*, 8: 23-28. [IF (2015).: 0,769]
9. **Kleiner D**, Kurucz D, Bersényi A, Szentmihályi K, Skesters A, Liga Z, Blázovics A. (2016) Berries, the antioxidant sources of the boreal cold and arid regions. *Acta Aliment*, 45: 317–322. [IF (2015).: 0,333]
10. **Kleiner D**, Mátis E, Süle K, Molnár J (2015a) A szelén élettani szerepe és jelentősége. *Gyógyszerészet*. 58: 148-153.
11. **Kleiner D**, Sárdi É, Ficsor E, Balázs A, Lemberkovics É, Blázovics A. A redox-homeosztázis és a transzmetilezés kapcsolata táplálkozás-élettani szempontból. Aktualitások a táplálkozástudományi kutatásokban, workshop. Megjelent: Aktualitások a táplálkozástudományi kutatásokban című workshop összefoglalói. Budapest, 2014: 6. (ISBN 978-963-88108-7-8)
12. **Kleiner D**, Süle K, Windisch V, Szabó G, Blázovics A. Citrus sinensis levének redox-paraméterei frissen facsart és gyárilag feldolgozott mintáiban. Aktualitások a

táplálkozástudományi kutatásokban, Ph.D. konferencia. Megjelent: Aktualitások a táplálkozástudományi kutatásokban című V. PhD Konferencia összefoglalói. Budapest, 2015b: 26. (ISBN 978-963-88108-8-5)

13. **Kleiner D**, Szilvás Á, Szentmihályi K, Süle K, Blázovics A. Fémelem-akkumuláció kemoterápia indukált kognitív funkcióromlás esetén. A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság VIII. Kongresszusa. Budapest, 2015c.
14. **Kleiner D**, Szilvás Á, Szentmihályi K, Süle K, Blázovics A. (2016) Changes of erythrocyte element status of colectomised cancerous patients: Retrospective study. *J Trace Elem Med Biol*, 33: 8-13. [IF (2015).: 2,55]
15. Skesters A, **Kleiner D**, Blázovics A, May Z, Kurucz D, Silova A, Szentmihályi K. (2014) Mineral element content and antioxidant capacity of some Latvian berries. *Eur Chem Bull*, 3: 98-101.
16. Tóth G, Sándor GL, **Kleiner D**, Szentmáry N, Kiss H, Blázovics A, Nagy ZZs. (2016) Szabadgyök-felszabadulás vizsgálata femtoszekundumos lézerrel asszisztált capsulotomiát követően. *Orv Hetil*, 157: 1880–1883. [IF (2015).: 0,291]

8.2. Egyéb közlemények

1. **Kleiner D**, Mátis E, Ditrói K. (2012) A kender (*Cannabis sativa* L.) magyar orvoslásban betöltött szerepe kábítószerrel nyilvánításáig. *Farmakognóziai Hírek*, 7: 2-4.