

Doktori (PhD) – értekezés tézisei

**Citotoxicitás, citoprotekció és antioxidáns kapacitás
vizsgálatok biológiai mintákban**



Baloghné Sali Nikolett

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Prof. Dr. Kőszegi Tamás

Programvezető: Prof. Dr. Miseta Attila

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Pécsi Tudományegyetem

Klinikai Központ

Laboratóriumi Medicina Intézet

Pécs, 2018

Rövidítések jegyzéke

7-AAD	7-aminoactinomycin D
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
AUC	area under the curve/görbe alatti terület
BCD	β -ciklodextrin
CAM	calcein-acetoxymethylester
CBB	Comassie Brilliant Blue
CD	ciklodextrin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DIMEB	2,6-di-O-methyl- β -cyclodextrin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNS	dezoxiribonukleinsav
DPPH*	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil gyök
ECL	erősített kemilumineszcencia
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FBS	fetal bovine serum/fötális borjúsérum
FDB	fluorescein-dibutyrate
FIS	fisetin
FITC	fluorescein-izotiocianát
FL	Na-fluorescein
GER	geraldol
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HepG2	human liver cancer-derived cells (sejtkultúra)
HPBCD	(2-Hydroxypropyl)-beta-cyclodextrin
hs-CRP	high sensitive-C-reaktív protein
LOD	limit of detection/kimutathatósági határ
MDCK	Madine, Darby canine kidney (sejtkultúra)
NaF	nátrium-fluorid
NaN ₃	nátrium-azid
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity/oxigéngyök abszorpciós kapacitás
OTA	ochratoxin A
PBS	foszfát pufferelt sóoldat
POD	torma-peroxidáz
SD	standard deviáció (szórás)
SEM	átlag standard hibája
TAC	total antioxidáns kapacitás
TE	Trolox ekvivalens
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic-acid
ZEA	zearalenon

1. Bevezetés

Régóta ismert tény, hogy a karotinoidok, a flavonoidok, egyéb polifenolok és sok más, elsődlegesen antioxidáns hatással bíró molekula optimális mennyiségű fogyasztása jelentős tényezőnek számít a krónikus degeneratív betegségek (malignus daganatok, autoimmun kórképek, szív – érrendszeri betegségek, stb.) prevenciójában. Az elvégzett nagyszámú epidemiológiai vizsgálatból, állatkísérletes modellekből és *in vitro* kísérletes rendszerekből nyert megfigyelések ellenére még mindig nem teljesen ismert a protektív növényi anyagok hatásmechanizmusa. Feltételezhető, és modell kísérletekkel részben alátámasztott is, hogy a citoprotekcióban az egyik legjelentősebb tényező az antioxidáns sajátosság. A természetes és szintetikus molekulák citoprotektív és toxikus hatásának tanulmányozásában egyaránt széles körben elterjedtek a lumineszcenciás sejt életképességi tesztek. Sejtes modellekben gyakran használt eljárás a szövetkultúrák károsító ágenssel történő kezelése és a toxikus hatás követése életképességi (viabilitás) tesztekkel. A viabilitás mérése – a kereskedelemben kapható nagyszámú kész reagens kit ellenére – valójában igen nehéz és komplex feladat, hiszen az előbb felsorolt mechanizmusok akár mindegyike szerepet játszhat a sejtek életképességének csökkenésében. Az egyik leggyakrabban alkalmazott viabilitás teszt az intracelluláris ATP biolumineszcenciás detektálása. A lumineszcenciás sejt-életképesség tesztek mind adherens, mind szuszpenziós szövetkultúrákban alkalmazhatók. Annak ellenére, hogy a lumineszcenciás életképesség vizsgálatok széles körben elterjedt módszerek, nagyon óvatossá kell lennünk a kapott eredmények megítélésében. Az életképesség adatokat gyakran nehéz értelmezni, mert az egyes sejtvonalak nem viselkednek egyformán és gyakran nehézséget okoz magának a mechanizmusnak a megértése is. Például az intracelluláris ATP szint konstansnak tekinthető az élő sejtekben és az ATP mennyisége azonosnak tekinthető az élő sejtek számával. Mivel az ATP turnover nagyon gyors, a különböző kezelésekre eltérő változások következhetnek be az intracelluláris ATP szintben (csökkenés vagy emelkedés), így az ATP adatok önmagukban véve nem mindig korrelálnak az élő sejtek számával és különösen az intracelluláris energiaellátást tükröző életképességgel. A hidrofób fluorofórok (leggyakrabban észter formában) nem fluoreszkálnak, könnyen belépnek az élő és elpusztult sejtekbe egyaránt. Egyszerű életképesség próbaként alkalmazzák a calcein-acetoxymethylester-t (CAM). A módszer arra a gondolatmenetre támaszkodik, hogy csak az élő sejtek tudják lehasítani az észter kötést, ezáltal azt eredményezve, hogy az ionizált, erősen fluoreszkáló termék a sejteken belül marad. Az enzimtevékenységen alapuló életképesség módszerek esetében – legyen az egy észteráz, oxido-reduktáz vagy proteáz függő folyamat – mindig fel kell tenni azt a kérdést, hogy

az enzimatikus folyamat valóban energia vezérelt-e és összefüggésben van-e a sejtek valódi viabilitásával. A másik nehézséget a fluoreszcens termék sejtekből történő spontán kiszabadulása, illetve transzport mechanizmusok, pl.: ATP függő ABC transzporter fehérjék jelentik. Annak érdekében, hogy a fent említett nehézségeket leküzdhessük, a lehető legtöbb információt kell megkapnunk ugyanabból a mintából. Mindig javasolt egy vagy több referencia-paraméter (összes intracelluláris fehérje vagy DNS tartalom) meghatározása, emellett pedig a fluoreszcencia számszerűsítése és az ATP adatok felvétele is annak érdekében, hogy az eredményeinket helyesen, megfelelően tudjuk értelmezni.

Az értekezésem két fő területet foglal magába. Az első rész a citotoxicitás, citoprotekció vizsgálatokat mutatja be *in vitro* sejtes modellekben metabolikus inhibitorokkal (NaF és NaN_3) és ochratoxin A (OTA) mikotoxinnal kezelt adherens szövettenyészetekben. Dózis-hatás összefüggést vizsgáltam egy általunk kidolgozott többparaméteres viabilitás esszével (intracelluláris ATP, észteráz aktivitásból származtatott fluoreszcencia, teljes fehérjetartalom és DNS mennyiség). Ehhez új, az irodalomban nem használatos perklórsavas extrakciós eljárást dolgoztam ki, melynek segítségével ugyanabból a mintából lehetővé vált a fenti paraméterek együttes meghatározása.

Továbbá tesztelni kívántuk, hogy a ciklodextrinek (CD-k) képesek-e befolyásolni a FIS és GER ismert antiproliferatív hatásait HepG2 máj tumor sejt vonalon. Vizsgáltuk a CD-k potenciális hatását egy xenoösztrogenikus mikotoxin, a zearalenon (ZEA) felvételére *in vitro* sejtes kísérletekben HepG2 májsejt kultúrákon.

A munka másik részében a citoprotekcióban jelentős szerepet játszó antioxidáns kapacitás méréseket mutatom be különböző biológiai mintákban. A totál, nem enzimatikus antioxidáns kapacitást (TAC) az általunk módosított erősített kemilumineszcenciás módszerrel (ECL), valamint az irodalomból ismert ORAC (Oxigéngyök Abszorpciós Kapacitás) és DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) stabil szabadgyökös esszével határoztam meg. A totál antioxidáns kapacitás mérések elvégzése eddig kevésbé ismert és vizsgált növényi minták alkoholos kivonatainak, valamint humán szeptikus betegcsoport szérum mintáinak felhasználásával történt.

2. Célkitűzések

2.1. Citotoxicitás, citoprotekció vizsgálata

2.1.1. Többváltozós lumineszcenciás sejt életképesség teszt toxikológiai modellekben

Irodalmi adatok alapján azt feltételeztük, hogy egyetlen paraméter (pl. ATP és/vagy calcein fluoreszcencia) nem ad pontos információt a metabolikus mérgekkel vagy a mikotoxinokkal kezelt szövettenyészetek életképességéről. Sejtes kísérleteink során több, ezzel kapcsolatos kérdésre kerestük a válaszokat:

- A detektált jel/paraméter arányos-e az élő sejtek számával?
- Léteznek-e olyan paraméterek, melyek nemcsak a mintában lévő sejtek számát, de azok életképességét is tükrözik?
- Van-e lehetőség az élő (kezeletlen), károsodott (kezelt), illetve a már elpusztult sejtek elkülönítésére?
- Léteznek-e megbízható, valóban az életképességet mutató paraméterek?
- Az általánosan elfogadott calcein észter festés valóban ATP-függő folyamat-e és alkalmas-e arra, hogy jelezze a sejtek viabilitását?

2.1.2. Flavonoidok (fisetin és geraldol) csapdázása béta-ciklodextrinnel

A fisetin a természetben általánosan előforduló flavonoid aglikon, egyik legfontosabb metabolitja a 3-O metilezett származéka, amit geraldolnak hívnak, amely a fisetin metilációja során keletkezik katekol-O-metil-transzferáz enzim által. A ciklodextrinek széles körben tanulmányozott gazdamolekulák, kúpos szerkezettel rendelkeznek, hidrofób belső és hidrofil külső térrel.

Munkánk során tesztelni kívántuk, hogy a ciklodextrinek képesek-e befolyásolni a FIS és GER ismert antiproliferatív hatásait HepG2 máj tumor sejtvonalon.

2.1.3. Zearalenon kölcsönhatásai natív és kémiaiilag módosított ciklodextrinekkel

A zearalenon egy széles körben elterjedt xenoösztrogenikus mikotoxin, melyet különböző *Fusarium* fajok termelnek. Korábbi tanulmányok kiemelték, hogy a BCD képes létrehozni stabil komplexeket különböző mikotoxinokkal, mint a citrinin, aflatoxin B1, ochratoxin A és zearalenon.

Tanulmányunk során célunk volt a ciklodextrinek potenciális hatását vizsgálni a ZEA felvételére *in vitro* sejtes kísérletekben HepG2 májsejt kultúrákon.

2.2. Antioxidáns kapacitás vizsgálatok biológiai mintákban

2.2.1. Módosított kemilumineszcenciás módszer kidolgozása, validálása

A nem enzimátikus teljes antioxidáns potenciál meghatározására az irodalomban számos különböző módszer létezik.

Munkánk fontos célkitűzése volt egy erősített kemilumineszcencián alapuló TAC módszer jelentős mértékű módosítása és validálása. További célkitűzésünk volt az ECL technikánk adaptálása lemezolvasó luminométerre és különböző biológiai mintákra, beleértve a növényi kivonatokat és emberi szérummintákat is. Demonstrálni kívántuk a szérum TAC analízisek lehetséges alkalmazását súlyos szisztémás gyulladás során kontrol és szeptikus betegcsoportok összehasonlításával.

2.2.2. Három kávéfaj magjának és termésfalának TAC mérése

A TAC analíziseink célja továbbá két kávéfaj, a *Coffea benghalensis* és a *Coffea liberica* esetében az érett/éretlen mag, illetve az érett/éretlen termésfal antioxidáns kapacitásának meghatározása és összehasonlítása volt a szakirodalomban már alaposan tanulmányozott *Coffea arabica*-val. Az elemzések célja volt továbbá, hogy találjunk új, potenciálisan gyógyhatású természetes antioxidáns forrásokat, illetve a kávétermékek „elvesztegetett” maradékának egy új hasznosítási lehetőségét. A növényi kivonatok antioxidáns kapacitásának meghatározására három különböző módszert alkalmaztunk: az általunk módosított erősített kemilumineszcenciás módszert (ECL), a klasszikus DPPH gyök megkötés mérést, illetve az ORAC esszét.

3. Vizsgálati módszerek

3.1. Citotoxicitás, citoprotekció

Az egyes kezelő oldatok hatásának vizsgálatához egy többparaméteres viabilitás módszert dolgoztunk ki. Ehhez elsőként Jurkat humán perifériás T-lymphoblast sejteken az FDB (fluorescein - dibutyrate) és CAM (calcein-acetoxymethyl ester) fluorofor-ok sejtbe jutását a fluoreszcencia intenzitás- és a polarizáció együttes mérésével követtük egy Hitachi F4500 fluoreszcens spektrofotométeren (37 °C, 490 nm gerjesztési és 520 nm kibocsátási hullámhosszon). Az OTA (5-50 µM), NaF (1-20 mM) és NaN₃ (1-10 mM) hatásának vizsgálatát egyrétegű sejtenyészetek, MDCK (Madine, Darby canine kidney; ATCC: CCL 34; immortalizált, tubuláris vesesejtek) és HepG2 (human liver cancer-derived cells; ATCC: HB-8065™, *homo sapiens*, epithelialis) sejtvonalakon végeztük. A kitapadó sejt kultúráknál 96 lyukú lemezek 4 különböző paramétert határoztunk meg ugyanabból a mintából (ATP, calcein fluoreszcencia, nukleinsav tartalom és összfehérje). A sejteket perklórsavval

fixáltuk/tártuk fel, ebből az ATP-t minden esetben biolumineszcenciás módszerrel mértük, a minták calcein fluoreszcenciáját a perklórsavas sejt-extraktum átlúgosítása után határoztuk meg Perkin Elmer EnSpire Multimode plate reader ($\lambda_{exc.}=490$ nm; $\lambda_{em.}=520$ nm) alkalmazásával. A fixált sejtek nukleinsav tartalmának (DAPI jelölés, $\lambda_{exc.}=355$ nm; $\lambda_{em.}=460$ nm) meghatározása szintén a Perkin Elmer EnSpire Multimode plate reader segítségével történt, area scan üzemmódban. Az intracelluláris protein meghatározáshoz a perklórsavval fixált sejteket 1 mol/l nátrium-hidroxiddal szolubilizáltuk. Az intracelluláris teljes fehérje tartalom meghatározás Bradford-reagenssel történt BioTek Synergie HT plate reader-en. Meghatároztuk az ATP/fehérje, az ATP/nukleinsav, a calcein fluoreszcencia/ATP és a DAPI/összfehérje hányadosokat is. Az eredményeket a kontrol, kezeletlen sejtekre kapott értékekhez viszonyítottuk és a kontrol %-ában adtuk meg. A kezelő ágensek okozta apoptózis/nekrózis arányt áramlási citometriás vizsgálatokkal (Beckman-Coulter FC500 típusú áramlási citométer) mértük, FITC-Annexin V/propidium jodid és 7-amino-actinomycin D jelölésekkel, az adatok elemzése CXP szoftver felhasználásával történt. Morfológiai vizsgálatokhoz fehérje festés mellett az aktin citoszkeletont is vizsgáltuk, fluoreszcenciásan jelzett falloidin segítségével, fluoreszcens mikroszkópban.

A FIS és GER flavonoidok β -ciklodextrinnel alkotott komplex formációjának vizsgálatát, valamint a ZEA natív és kémialilag módosított CD-kel alkotott kölcsönhatásainak vizsgálatát adherens HepG2 sejtenyészeteken végeztük el. A kitapadó, egyrétegű sejtenyészeteket DMEM típusú, magas glükóz tartalmú (4,5 g/l) médiumban tartottuk fenn 10% FBS, valamint penicillin (100 U/ml) és streptomycin (100 μ g/ml) jelenlétében, standard protokoll szerint. A feltripszinezett sejteket (1 ml tripszin-EDTA/25 cm² flaska) 30 ml médiumba pipettáztuk és 96 lyukú (250 μ l/lyuk, 10⁴ sejt), 24 lyukú (500 μ l/lyuk, 2x10⁴ sejt) vagy 6 lyukú (2 ml/lyuk, 8x10⁴ sejt) sejtenyésztő lemezen növesztettük 24 órán át (37 °C, 5% CO₂). Eltávolítottuk a tápközeget, helyére új médiumot vagy puffert pipettáztunk, amely tartalmazta a vizsgálatához szükséges, megfelelő mennyiségű toxikus anyagot. A kezelések után a sejteket többször mostuk (PBS), majd perklórsavban fixáltuk/extraháltuk a mintákat a többparaméteres életképességi teszt méréseknél. A többváltozós lumineszcens sejt életképesség tesztek során minden kezelést 5 egymástól független kísérletben (lemez) végeztünk el, 16 technikai ismétlést alkalmazva kezelő ágensenként.

Statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA tesztet végeztünk, amikor egy adott sejtvonalra és egy bizonyos típusú kezelésre vonatkozó százalékos adatokat hasonlítottunk a kontrolhoz (~ 100 %). A Student-féle t-tesztet alkalmaztuk, amikor az azonos kezelésen átesett két sejtvonal összehasonlítását végeztük el. A Spearman-féle korrelációt alkalmaztuk akkor, amikor a DAPI

és protein adatok összehasonlítását végeztük egy sejtvonalon és egy kezeléson belül. IBM SPSS Statistics, Version 20 programot használtuk. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értéknél határoztuk meg.

A FIS és GER kezelt HepG2 sejtek esetében a kapott eredmények 3 független kísérletből származtak. A statisztikai elemzéseket az egyutas ANOVA teszttel végeztük (IBM SPSS Statistics, Version 21), ahol a szignifikancia szint $p < 0,05$ volt.

A CD-k jelenlétében vagy anélkül ZEA-val kezelt HepG2 sejtek esetében a közölt adatok (átlag \pm SEM) legalább 3 független kísérletből származtak. A statisztikai elemzéseket szintén egyutas ANOVA teszttel végeztük (IBM SPSS Statistics, Version 21). A szignifikancia szint $p < 0,05$ volt.

3.2. Antioxidáns kapacitás vizsgálatok

Az erősített kemilumineszcencián (ECL) alapuló antioxidáns méréseink beállításához, a jel időbeni lefutásának követéséhez Berthold Lumat LB9507 csöves luminométert, a sorozat mérésekhez egy programozható injektorral felszerelt BioTek Synergy HT plate reader-t alkalmaztunk. Az injektorral felszerelt Berthold csöves luminométert kinetikus mérés módban használtuk. Az alkalmazott reagensünk albuminnal stabilizált peroxidáz enzimet (POD) és hidrogén peroxidot tartalmazott, a kemilumineszcenciás jelet luminol és 4-jodofenol adta POD/H₂O₂ jelenlétében. A méréseket Trolox-ra (vízoldékony E vitamin származék) standardizáltuk. Csöves luminométernél a vakot/std-ot/mintát/H₂O₂ oldatot tartalmazó csövekbe 0 °C-os POD-ECL reagenst injektáltuk. A mérési intervallum 2 másodperc volt, 400 másodperces teljes mérési idővel. A Biotek Synergy HT lemezleolvasó készülék segítségével végzett méréseinkhez 96-lyukú optikai fehér lemezeket használtunk. Az ECL-POD munkaoldatot előre összekevertük közvetlenül a mérések előtt és 0 °C-on tartottuk fénytől elzárva. 20 μ l vakot/standardot/mintát pipettáztunk a mikrolemezen a lyukakba hármas vagy több parallelben. Majd 270 μ l POD-ECL keveréket pipettáztunk 8-csatornás pipetta használatával minden egyes lyukba, ezt követően a lemezt 10 másodpercig rázattuk horizontális rázaton. Az ECL reakciót 20 μ l H₂O₂ automata injektálásával indítottuk a lemezleolvasó programozható injektorát használva. A minták lumineszcenciáját 10 percig monitoroztuk 64 másodperces intervallumokkal és 0,2 másodperc volt a detektációs idő/lyuk. Az antioxidáns kapacitást a fényjel görbe alatti területe (AUC) vagy a jel időbeni késleltetése alapján számoltuk ki, Trolox standard sorozat (0-100 μ M) segítségével. ECL módszerünket validáltuk, melynek során meghatároztuk a kimutathatósági határt (LOD), a pontosságot, a linearitást és a visszanyerést is.

A DPPH módszer mérésére monokromátorokkal felszerelt Perkin Elmer EnSpire Multimode lemezleolvasót használtunk abszorbancia módban. A módszer standardizálásához szintén Trolox sort használtunk (0-266,4 μM). 30 perces, 25 °C-on sötétben történő inkubálás után 517 nm-n mértük az abszorbanciát. Az antioxidáns kapacitás értékeket a kalibrációs egyenes alapján számítottuk ki, vagy a vak %-ában fejeztük ki a növényi kivonatok antioxidáns aktivitását a következő képlet segítségével: $(A_{\text{vak}} - A_{\text{minta}}/A_{\text{vak}}) \times 100$. A TAC értékeket Trolox ekvivalens (TE, $\mu\text{mol/g}$) szárított növényre vonatkoztatva adtuk meg vagy %TAC/g-ban.

Az ORAC esszé mérése szintén a Biotek Synergy HT lemezleolvasón valósult meg fluoreszcencia módban 37°C-on 490 nm gerjesztési és 520 nm kibocsátási hullámhosszokon. A mérést általánosan elfogadott protokoll szerint végeztük, kis módosítással. Oxidánsként AAPH-t, riporter molekulaként Na-fluoreszceint (FL), standardként Trolox sort (0-266,4 μM) használtunk. A mérés 80 percig tartott, 150 másodpercenként volt egy leolvasás lyukanként. A TE-t úgy számítottuk ki, hogy a Trolox standardra kapott görbe alatti terület értékeiből (AUC) kivontuk a vak AUC értékek fluoreszcencia intenzitását (nettó görbe alatti terület, net AUC) és a net AUC értékeket a Trolox standardok koncentrációjához viszonyítottuk. A vizsgált növényi mintákra vonatkozó TE adatokat a standardokra kapott regressziós egyenletek alapján számítottuk és 1 g szárított növényre vonatkoztattuk.

A vizsgálataink során alkalmazott növényi kivonatok a következők voltak: édesgyökér (*Glycyrrhiza glabra*), közönséges cickafark (*Achillea millefolium*), közönséges farkasalma (*Aristolochia clematitis*), közönséges csarab (*Calluna vulgaris*), pirosuló hunyor (*Helleborus purpurascens*), európai homoktövis (*Hippophäe rhamnoides*), keserűfű (*Polygonum lapathifolium*), baracklevelű keserűfű (*Polygonum maculosa*), libapimpó (*Potentilla anserina*), enyves zsálya (*Salvia glutinosa*), ligeti zsálya (*Salvia nemorosa*). A növények földfeletti részeit Romániában és Magyarországon (2015 és 2016) gyűjtöttük be természetes élőhelyükről. Ezeket a növényeket, a Romániában gyűjtött etnomedicinális adatok elemzése alapján választottuk ki, az adatokat tudományos adatbázisokból nyertük. A felsorolt növények antioxidáns kapacitásáról csak néhány feljegyzés állt rendelkezésünkre. A begyűjtött növényeket szobahőmérsékleten szárítottuk. Minden egyes növényből 0,5 g szárított kivonatot extraháltunk 10 ml 50% etanolban 30 percig tartó folyamatos rázatás mellett horizontális rázaton (200 rpm). A kivonatot szűrtük és -20 °C-on tároltuk a felhasználásig.

A három vizsgált kávéfaj, a *C. arabica*, *C. benghalensis* és *C. liberica* növényi mintáinak begyűjtése 2014 és 2015 tavaszán történt a Pécsi Tudományegyetem Botanikus kertjében. Mindhárom vizsgált faj esetében az éretlen és érett termésfalat, valamint az éretlen és érett magokat használtuk fel az antioxidáns vizsgálatainkhoz. A növényi kivonatok 0,25 g szárított

növény/5 ml oldószerrel (50% etanol) készültek, az extraktumok rázatása 20 percig tartott, majd szűrés után -20 °C-on tároltuk őket a felhasználásig.

Tanulmányi protokollunkat, mely során humán szérum minták analizését végeztük, a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatás Etikai Bizottsága engedélyezte és a 2003-s Helsinkai nyilatkozat etikai irányelvei alapján végeztük munkánkat. A kutatásunkban szereplő összes betegről vagy hozzátartozójától írásos beleegyezést kaptunk, miután részletesen tájékoztattuk őket a vizsgálat menetéről és a szükséges vérminták nyéréséről. Kialakítottuk a kontrol és a szeptikus betegek csoportját. A kontrol csoportot a Pécsi Tudományegyetem Szemészeti Osztályának ambuláns szemészeti betegei alkották, akiknek nem volt akut és krónikus gyulladáson vagy fertőző betegsége. A betegek csoportjában azok vettek részt, akiknél szepszist vagy súlyos szepszist diagnosztizáltak. A szeptikus betegeket a Pécsi Tudományegyetem Intenzív Terápiás Intézetében kezelték. A szeptikus betegcsoport esetében egy nyomon követéses vizsgálatot végeztünk az Intenzív Osztályon történő tartózkodásuk alatt. Szérummintákat analizáltunk a klinikai diagnózis felállítását követően 1, 2, 3 és 5 nap elteltével. A kontrol csoportban egy betegről csupán egy vérminta állt rendelkezésünkre. A szeptikus betegcsoportot tovább osztottuk túlélő és nem túlélő csoportra a 7 napos mortalitási adatok alapján. Minden betegről vénás vért kaptunk natív csövekben zárt mintavevő rendszer alkalmazásával. 45 perc után az alvadt vérmintákat 10 percig 1500 g-n centrifugáltuk és a szérumokat a felhasználásig lefagyasztottuk -80 °C-ra eppendorf csövekben.

A különböző biológiai mátrixokban végzett kísérleteink során a statisztikai elemzéshez az IBM SPSS Statisztikát használtuk (Windows), 22. program verzió. Az adatok megoszlását Shapiro-Wilk teszttel értékeltük. Mivel adataink normál eloszlást mutattak, így a betegcsoportok közötti különbségek vizsgálatára a független mintájú t-tesztet alkalmaztuk. Egyutas ANOVA tesztet alkalmaztunk a nyomon követéses vizsgálatok összehasonlítására. A kvantitatív paraméterek közötti lehetséges összefüggéseket Pearson rangkorrelációs tesztjeivel határoztuk meg. Amikor a két antioxidáns kapacitás mérő módszert hasonlítottuk össze, Bland Altman és Passing Bablock analíziseket használtunk. Az adatokat átlag +- SEM formában fejeztük ki, Bland és Altman analízisben SD-t használtunk, $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. Eredmények és megbeszélés

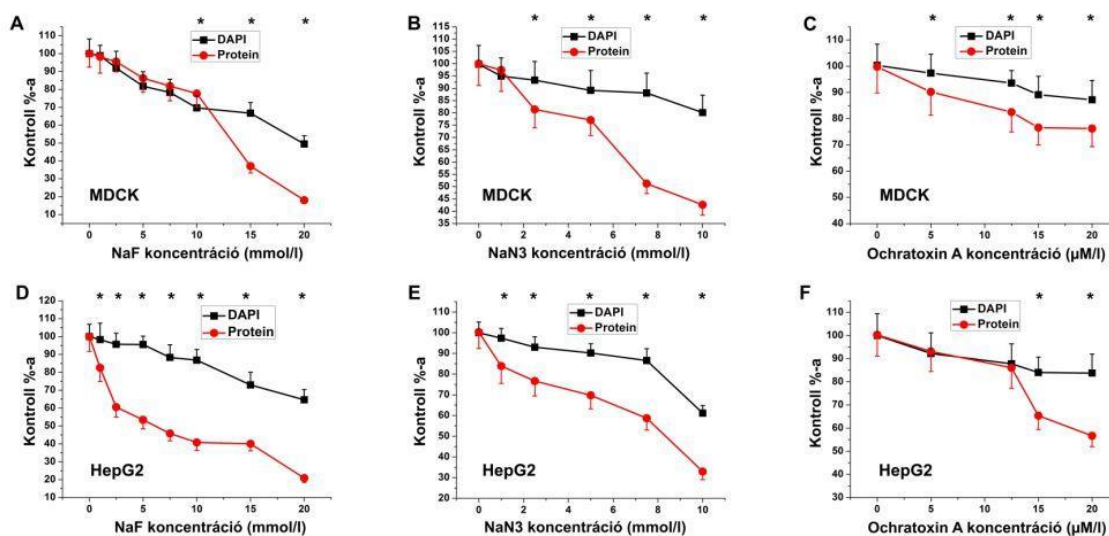
4.1. Életképesség vizsgálatok in vitro szövettenyészetekben (citotoxicitás, citoprotekció)

4.1.1. Intracelluláris fluoreszcencia adatok értelmezése

Az FDB -ből származó fluoreszcens jel jó korrelációt mutatott a szuszpenziós Jurkat sejtek számával ($R^2 = 0,959$, FDB: $1,6 \mu\text{M}$, $1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$ sejt/ml, $n=42$). Mind az FDB, mind a CAM nem hidrolizált jelölők háttér-fluoreszcenciája alacsony, sejt szuszpenziók esetében nincs szükség a sejtek lízisére. A képződött fluoreszcein és calcein molekulák eloszlása (sejten belül/kívül) Jurkat sejtekben különböző volt. A kontrol (Na-fluoreszcein kezelt) minta egyformán alacsony fluoreszcencia polarizációt (P-értékeket) mutatott, míg a calcein polarizációja nőtt az idővel arányosan, végül telítésbe ment. Az FDB-ből származó fluoreszcein a P-értéknek csak átmeneti növekedését idézte elő, mely azután erősen lecsökkent. Ez azt jelzi, hogy az FDB belép a sejtekbe, de rövid időn belül ki is szabadul onnan. Ezek az adatok azt sugallják, hogy az erősen töltött calcein elhanyagolható mértékben áramlik ki a sejtekből, míg a kevesebb negatív töltéssel rendelkező, FDB-eredetű fluoreszcein pedig könnyen elhagyja a sejteket. Az optimális inkubációs idő a CAM esetében 40 perc volt.

4.1.2. Perklórsavas (PCA) extrakciós módszer ATP, calcein, DAPI fluoreszcencia és teljes fehérje tartalom meghatározására

Munkánk egyik fő célja volt az általunk újonnan kifejlesztett PCA extrakciós módszer alkalmazása több életképességi paraméter meghatározására ugyanabból a sejtmintából. Az ATP-t és calceint egyidejűleg nyertük ki perklórsavval a mosott sejtekből a calcein fluoreszcencia elvesztése nélkül. A savas extrakcióval kinyert (és alkalinizált) calcein fluoreszcenciáját összehasonlítottuk a detergenses (Triton X-100) feltárással nyert calcein fluoreszcencia intenzitásával. Student féle t próbával a kétféle feltárás közt szignifikáns eltérést nem találtunk ($p = 0,374$). A PCA fixált sejteket DAPI-val is meg tudtuk jelölni. A DAPI fluoreszcencia/lyuk adatok laza korrelációt mutattak a sejtek teljes fehérje szintjeivel (1. ábra). Az NaN_3 kezeléssel átesett MDCK, valamint az NaF-el kezelt HepG2 sejtek esetében szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a fehérje tartalomban a DAPI fluoreszcenciához képest, a többi mintától eltérően. Habár a Spearman féle t-teszt segítségével, az intracelluláris fehérje tartalom és a sejtszám között elvégzett korrelációs becslés elég jó volt ($R^2=0,8-0,99$), a DAPI fluoreszcenciával meghatározott sejtszám jóval stabilabb paraméternek bizonyult, mint a fehérje szintek.



1. ábra: NaF (A,D), NaN₃ (B,E) és OTA (C,F) kezelések dóziszfüggő hatása a DAPI fluoreszcenciaként kifejezett sejtszámra és a teljes intracelluláris fehérje tartalomra MDCK és HepG2 sejt kultúrákban. DAPI (nukleinsav festődés adatok) vs. teljes intracelluláris fehérjetartalom a kontroll sejtek %-ban kifejezve (átlag ±SD, 5 független kísérlet, n=5 x 16 párhuzamos mérés minden koncentráció esetén). *: szignifikáns eltérés a DAPI és teljes fehérje adatok között (Spearman's rank korrelációs analízis, p<0,05).

4.1.3. Viabilitás paraméterek értelmezése ATP depléciót követően

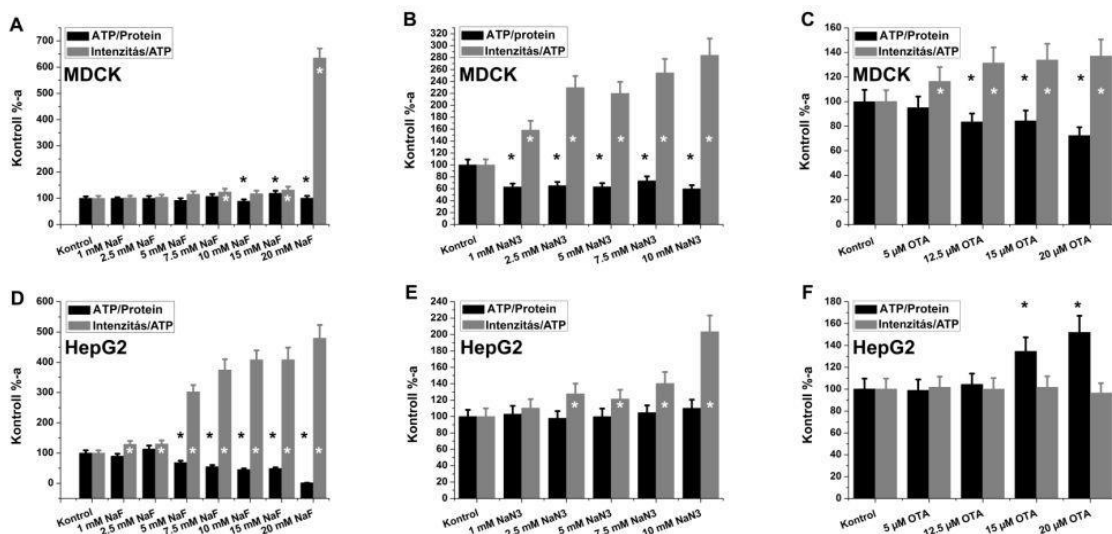
4.1.3.1. NaF és NaN₃ kezelés

Mindkét ágens az alkalmazott 4 órás kezelés során dózistól függő módon drámaian csökkentette az intracelluláris ATP- és fehérje szintet mindkét sejt vonalban. A calcein fluoreszcencia nem korrelált szorosan az ATP- és fehérje adatokkal. Mind az NaN₃, mind az NaF esetében alkalmazott legmagasabb toxin koncentrációk hatására gyakorlatilag teljesen elvesztették a sejtek az intracelluláris ATP tartalmukat, a calcein fluoreszcenciának azonban kb. 40-80%-a megmaradt a 100%-os kontrolhoz képest. A két sejt vonal a különböző típusú kezelésekre nem reagált egyformán. Mindkét sejt vonal esetén inverz összefüggést találtunk az ATP/protein, valamint a fluoreszcencia/ATP arányok között, viszont a HepG2 sejtek érzékenyebbek voltak az NaF kezelésre, mint az MDCK sejt vonal (2. A,D ábra). NaN₃ kezelés hatására a fluoreszcencia/ATP arányok sokkal szembetűnőbben emelkedtek a HepG2 májsejtekben (2. B,E ábra).

4.1.3.2. OTA kezelés

Az MDCK és HepG2 sejt vonalakra vonatkoztatott adatokat a 2. C,F ábra mutatja be. Az intracelluláris ATP szint mindkét sejt vonal esetén dóziszfüggő módon csökkent az ochratoxin A-val történő kezelése hatására, bár az MDCK sejtekben hangsúlyosabb volt az ATP depléció. A májeredetű HepG2 sejtek viszont több intracelluláris fehérjét veszítettek el. Dóziszfüggő, de enyhe csökkenés volt megfigyelhető a calcein fluoreszcencia/fehérje szintekben a

vesesejtekben. A két sejtvonal eltérően reagált az azonos OTA kezelésekre. Az MDCK sejtekben az ATP/fehérje arány csökkent, míg a calcein fluoreszcencia/ATP arány növekedett. Ezzel szemben a HepG2 sejtekben nagyobb fehérjevesztés volt megfigyelhető 15-20 μM OTA kezelés mellett, az ATP/fehérje értékek kissé emelkedtek, míg a calcein fluoreszcencia/ATP adatok változatlanok maradtak (2. C,F ábra). A kapott adatok összesítésekor a fluoreszcencia/teljes intracelluláris fehérje szintek között volt megfigyelhető a legszembetűnőbb különbség a két sejtvonal között NaF és OTA kezelése mellett. A májsejtek esetében magasabbak voltak az egységnyi fehérjére jutó fluoreszcencia értékek.



2. ábra: NaF (A,D), NaN₃ (B,E) és OTA (C,F) kezelése hatás MDCK és HepG2 sejtvonalakon. Az adatok a kontrol sejtek %-ában vannak kifejezve ATP/protein, valamint calcein fluoreszcencia/ATP hányadosok formájában (átlag \pm SD, 5 független kísérlet, n=5x16 párhuzamos mérés minden koncentráció esetén). *: kontroltól való szignifikáns eltérés (egy-utas ANOVA teszt, p<0,05).

4.1.3.3. Apoptózis esszé

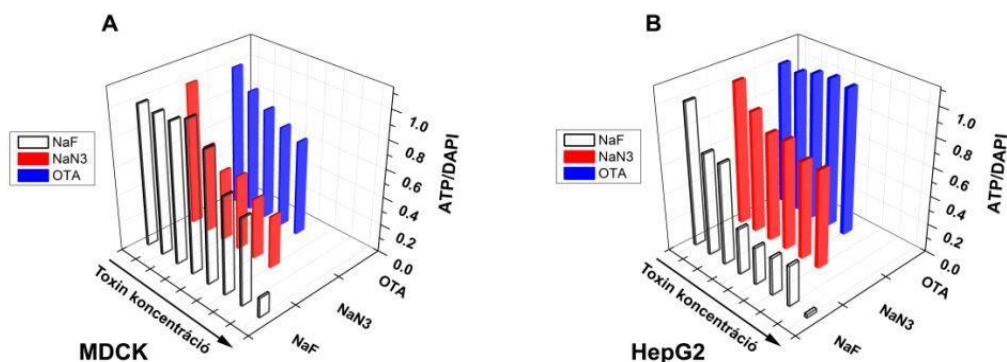
NaF és OTA kezelése esetén az apoptotikus/nekrotikus sejtek arányának meghatározását áramlási citometriás módszerrel végeztük két különböző apoptózis esszé felhasználásával [FITC-Annexin-V/propidium jodid és 7-AAD (7-aminoactinomycin D) módszer], melyek nem adtak egyforma eredményt, különösen az ép sejtek százalékos arányát illetően. A 20 mM NaF-el történő kezelés a korai apoptotikus sejtek számának drámai növekedését okozta. Érdekes, hogy az OTA kezelés esetén pedig pont a 7-AAD módszer jelzett sokkal nagyobb apoptózis arányt, mint a FITC – Annexin V/propidium jodide meghatározás. Az elhalt (nekrotikus) sejtek aránya hasonló volt a két módszer során. A 7-AAD módszer esetén a nem festődő kis részecskéket sejttörmelékeknek tekintettük. A FITC-Annexin V/PI mérés során, ahol két különböző színű fluoreszcencia intenzitást elemeztünk, a sejttörmelékot kapztuk.

4.1.3.4. Morfológiai elemzés

A CBB (Comassie Brilliant Blue R250) – vel festett kontrol sejtek normál morfológiát mutattak, jól látható volt a finom fehérje-és nukleoláris struktúra is. Az 5 μM OTA kezelés jelentős változást még nem okozott, azonban mindkét sejtvonalon esetén több olyan sejt volt megfigyelhető, ahol csökkent a festődés intenzitása, míg a kondenzált sejtek száma pedig nőtt. A 12,5 μM OTA kezelés esetén már jelentős sejtszám csökkenés volt megfigyelhető, a festés intenzitása csökkent, jelezve a sejtekben az intracelluláris fehérje veszteséget (vagy csökkent szintézist). 20 μM OTA esetében is hasonló képet kaptunk, de itt további csökkenést lehetett detektálni a festődés intenzitásában. Az OTA koncentrációjának növekedésével párhuzamosan mindkét sejtvonalon csökkent a sejtszám, de az MDCK sejtekben kifejezettebb volt az intracelluláris struktúrák szervezetlensége. A kezeltlen sejtek esetén az aktin citoskeleton normál morfológiát mutatott. Mindkét sejtvonalon megjelentek a kondenzált sejtek az OTA koncentráció növelésének hatására, de az aktin filamentumok szervezetlensége a veseeredetű sejtekben hangsúlyosabb volt. Az MDCK sejt kultúrában a kondenzált sejtek a sejtekből kiálló apró kis aktin tüskéket mutattak, míg a májsejtek kevésbé voltak érintettek e téren.

4.1.3.5. ATP/DAPI adatok értelmezése

Mind az ATP értékeket, mind a nukleinsav tartalmat (DAPI fluoreszcencia) százalékos arányban fejeztük ki a kontrolhoz (100%) képest. Amikor az ATP értékeket a nukleinsav tartalomra vonatkoztattuk markáns különbségeket figyeltünk meg a két sejtvonalon között. Az ATP depléció mértéke az NaF és az NaN_3 kezelt sejtek esetén volt a legjelentősebb, nukleinsav tartalomra vonatkoztatva. Azt tapasztaltuk, hogy a májsejtek érzékenyebbek voltak az NaF kezelésre, míg kevésbé érzékenyen reagáltak az NaN_3 kezelésre a vese sejtekhez képest (3. A,B ábra, NaF és NaN_3). Az OTA a HepG2 sejtekben arányosan csökkentette mindkét paramétert, míg az MDCK sejtek esetén az ATP depléció mértéke meghaladta a sejtszám veszteséget (3. A,B ábra, OTA).

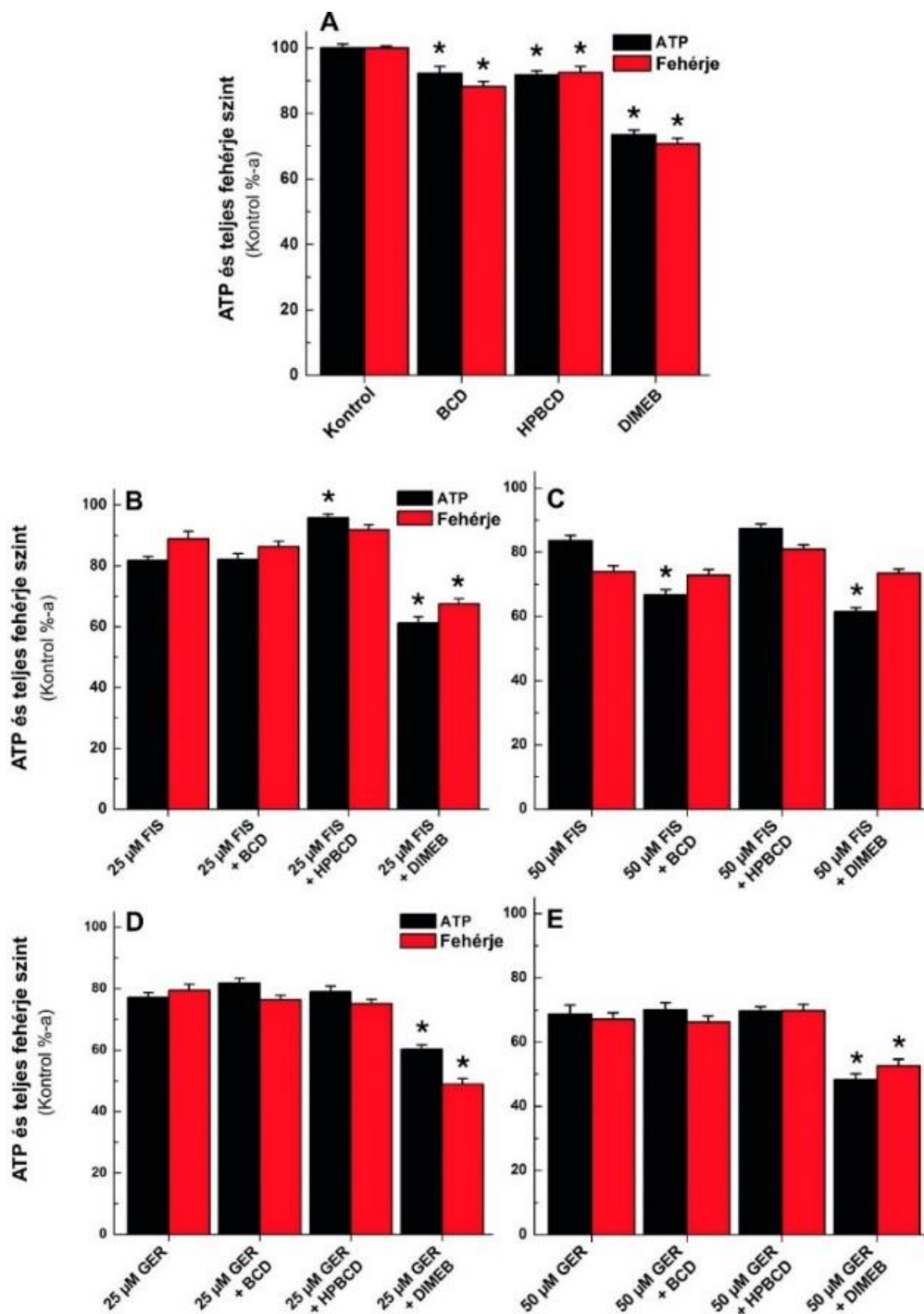


3. ábra: NaF, NaN_3 és OTA kezelésen átesett MDCK és HepG2 sejt vonalak nukleinsav tartalomra (DAPI) vonatkoztatott ATP értékei.

4.2. Fisetin és geraldol flavonoidok komplex formációja béta-ciklodextrinnel

4.2.1. A ciklodextrinek jelentősége a fisetin és geraldol sejtes hatásai tekintetében

Mivel a flavonoid-CD komplexek kötési állandói szignifikáns különbséget mutattak, kíváncsiak voltunk, hogy a FIS-CD és a GER-CD komplexek, hogyan befolyásolják ezen flavonoidok sejtes hatását. Éppen ezért megvizsgáltuk a FIS és a GER antiproliferatív hatását CD-k jelenlétében, HepG2 máj daganatos sejtvonal alkalmazásával. Azt is vizsgáltuk, hogy a BCD, HPBCD és DIMEB milyen hatással vannak a FIS és a GER sejtes aktivitására. Először a FIS és GER hatását teszteltük HepG2 sejteken 0-100 μM közötti koncentráció tartományban. 24 órás inkubáció után az ATP és a teljes fehérje tartalom alapján a sejtek életképesség csökkenését figyeltük meg. Az alkalmazott körülmények között a flavonoidok nagyon magas IC-50 értékét határoztuk meg (GER kb. 80 μM , FIS >100 μM). Mivel megpróbáltunk jelentős sejt életképesség csökkenést indukálni, de nem akartunk extrém magas flavonoid koncentrációkat alkalmazni, így következő kísérleteink során HepG2 sejteket kezeltünk 25 és 50 μM flavonoid koncentrációval 1 mM CD jelenlétében vagy hiányában. 24 órás inkubáció után számszerűsítettük a HepG2 sejtek ATP- és teljes fehérje szintjét. Ezek a mechanizmusok a sejtes ATP termelés csökkenését eredményezik. A közelmúltban végzett vizsgálatok kiemelték, hogy a CD-k képesek kölcsönhatásba lépni a D-luciferinnel és ez zavarja a biolumineszcenciás mérést. Éppen ezért meghatároztuk a HepG2 sejtek teljes fehérje tartalmát is. Ahogyan a 4. ábra szemlélteti, az ATP és a totál protein szintek jó korrelációt mutattak. A BCD és HPBCD önmagában szignifikánsan, de viszonylag enyhén csökkentette az ATP- és a teljes fehérjetartalom szintet, míg a DIMEB mindkét sejtes paraméter esetében kb. 30%-os csökkenést eredményezett, mely összeegyeztethető a korábbi megfigyeléseinkkel (4. A ábra). Mind a FIS, mind a GER az ATP és teljes fehérjeszint szignifikáns csökkenését eredményezte ($p < 0,01$). Amikor a HepG2 sejteket együttesen kezeltük FIS-el és CD-vel, akkor az ATP és fehérje koncentrációnak csak kismértékű változása volt megfigyelhető (4. B,C ábra). Amikor a sejteket 25 μM FIS-el és 1 mM DIMEB-el kezeltük, akkor ez az ATP és fehérje szintekben is szignifikáns csökkenést eredményezett. A DIMEB önmagában is ezen paraméterek jelentős csökkenését idézte elő. Ezért ésszerű azt feltételezni, hogy ez a hatás a FIS és a DIMEB additív hatásai miatt következett be és nem a FIS-DIMEB komplex kialakulása miatt. Továbbá a BCD és a HPBCD együttes jelenléte a GER-el történő kezelés alatt nem okozott szignifikáns változást, összehasonlítva a csak GER-el történő kezelésekkel (4. D,E ábra).

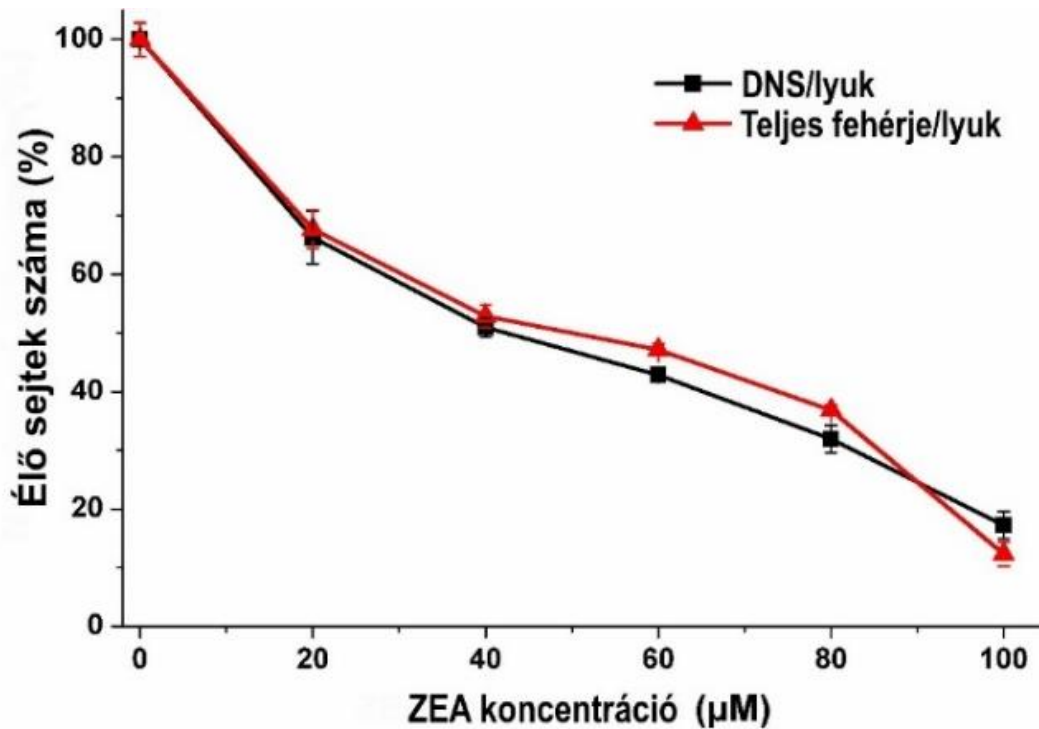


4. ábra: HepG2 sejtek intracelluláris ATP- és teljes fehérje tartalma 24 órás, ciklodextrinekkel (1 mM, A) történő kezelést követően, 25 és 50 μ M fisetin+ ciklodextrinek (B és C) és 25 és 50 μ M geraldol+ciklodextrinek (D és E) (* $p < 0,05$).

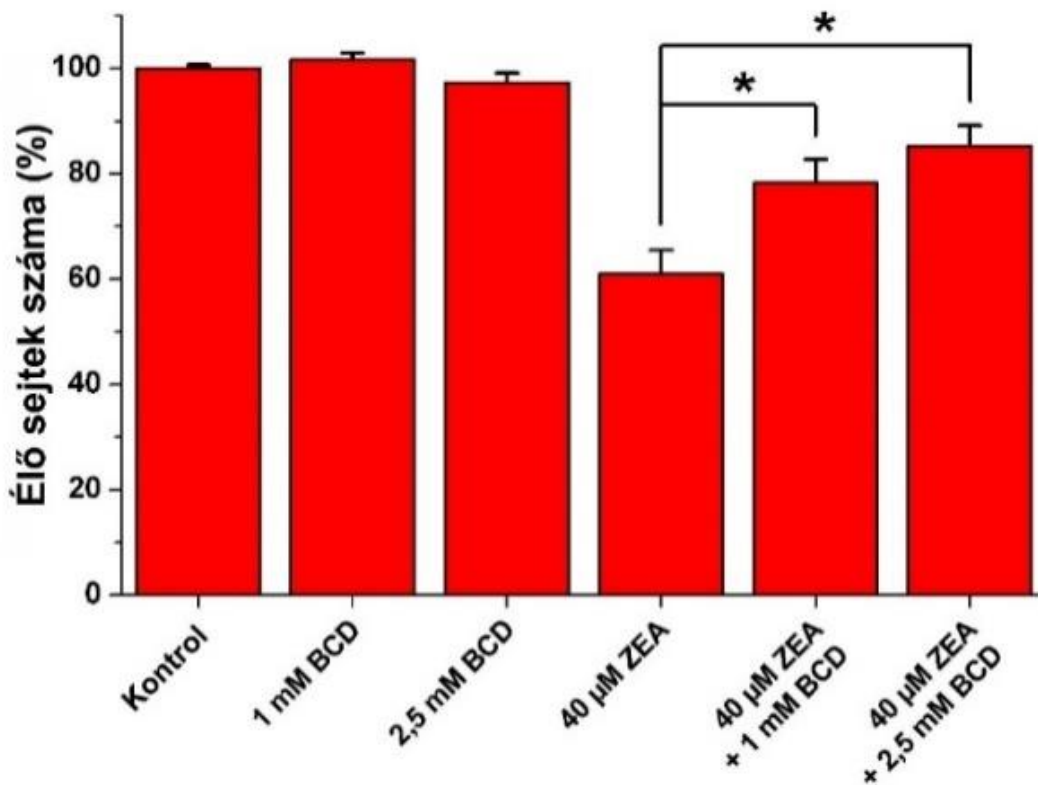
4.3. Zearalenon kölcsönhatásai natív és kémiaiag módosított ciklodextrinekkel

4.3.1. BCD és DIMEB befolyása a ZEA toxikus hatására in vitro

Először a ZEA dózisfüggő hatását vizsgáltuk HepG2 sejteken. 24 órás 20-100 μM ZEA kezelést követően az élő HepG2 sejtek számában koncentráció függő csökkenés volt megfigyelhető (5. ábra). A teljes nukleinsav- és fehérje tartalmak nagyon jó korrelációt mutattak, azt jelezve, hogy az alkalmazott módszerek valóban tükrözik az élő sejtek számát a lemez egyes lyukaiban. Mivel előkísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a 40 μM ZEA kezelés kb. 40-50 %-al csökkenti le az élő sejtek számát, így ezt a koncentrációt választottuk ki annak érdekében, hogy a következő vizsgálataink során teszteljük a CD-k lehetséges hatásait a ZEA által indukált toxicitási folyamatokra. A sejteket ZEA-val (40 μM) és BCD-vel (1 vagy 2,5 mM) kezeltük önmagában, valamint kombinációban. Ahogyan azt a 6. ábra mutatja, az alkalmazott BCD koncentrációk önmagukban sem negatív, sem pozitív hatást nem fejtettek ki a HepG2 sejtekre. A ZEA-val történő kezelés a sejtszám jelentős csökkenését idézte elő, a korábbi megfigyelésekhez hasonlóan. Azonban, amikor a sejteket egyidejűleg kezeltük ZEA-val és BCD-vel, akkor a BCD jelentősen csökkentette a ZEA toxikus hatását koncentrációfüggő módon. Kb. 18-25 %-al nőtt meg az élő sejtek száma 1 és 2,5 mM BCD jelenlétében a kontrolhoz viszonyítva. Hasonló kísérleteket végeztünk DIMEB-el is, a ZEA DIMEB-el képzett formája sokkal stabilabb volt, mint a natív BCD-vel képzett komplex. Érdekes, hogy 1 mM DIMEB jelentős csökkenést okozott az élő sejtek számában (kb. 20-30 %), de ZEA-val együtt alkalmazva sem volt pozitív hatása (az adatokat nem szemléltetjük). Továbbá, 0,5 mM DIMEB nem volt káros hatással a HepG2 sejtekre az alkalmazott körülmények között, viszont szignifikánsan pozitív vagy negatív változásokat a ZEA-kezelt sejtek esetében sem figyeltünk meg 0,5 mM DIMEB jelenlétében sem (az adatokat nem szemléltetjük).



5. ábra: HepG2 sejtek teljes DNS- és fehérje szintjének csökkenése/lyuk (DAPI festés és Bradford reakció alapján) 24 órával a 0-100 μM ZEA kezelést követően.



6. ábra: Élő HepG2 sejtek száma ZEA (40 μM) és/vagy BCD (1,0 és 2,5 mM) jelenlétében 24 órás kezelést követően teljes DNS tartalom/lyuk alapján. A teljes fehérje mérés során kapott eredmények nagyon jó egyezést mutattak a DAPI festés eredményeivel. Az alkalmazott BCD koncentrációk jelentős mértékben enyhítették a ZEA által előidézett életképesség veszteséget (* p < 0,05).

4.4. Antioxidáns kapacitás tesztek (DPPH, ECL és ORAC)

4.4.1. Módosított kemilumineszcenciás módszer kidolgozása, validálása

4.4.1.1. Munkareagens optimalizálása

Az első lépés a POD vezérelt kemilumineszcens reakció optimális összetételének beállítása volt. Amikor a H₂O₂ szinteket és a POD koncentrációt változtattuk, a fénykibocsátást 700 másodpercig követtük nyomon 2 másodperces felbontásban fotonszámláló fluoriméteren. Eredményeink azt mutatják, hogy a magas enzim aktivitás hamar kimerítette a szubsztrátot, míg a 15 µU/ml POD aktivitás szinte állandó fénykibocsátást eredményezett a mérésekhez ideális intenzitás tartományban mind a csöves luminométer, mind a lemezleolvasó esetében. Abban az esetben, amikor a POD aktivitását állandó értéken tartottuk (15 µU/ml) és a H₂O₂ koncentrációt változtattuk, minden H₂O₂ koncentráció konstans fényjelet adott, de a csöves luminométer felső kimutatási határa miatt (kb. 1450000 RLU/s) az 1,5 mmol/l H₂O₂ koncentrációt választottuk ki. Minden további mérésnél 15 µUnit/ml POD-t és 1,5 mM H₂O₂-t alkalmaztunk, amikor előállítottuk a munka reagenst. Kiszámítottuk a teljes fénykibocsátás/perc értéket is és összehasonlítottuk a szubsztrát koncentrációjával. A H₂O₂ szint kisebb volt, mint a torma peroxidáz Michaelis állandója és lineáris illeszkedést találtunk a reakciósebesség és a szubsztrát koncentráció között, mely egy első rendű kinetikát jelentett ($y = 7\,627\,325x - 5\,491\,309$, $R^2 = 0.9877$, ahol y a sebesség és x a szubsztrát koncentrációja). A másik oka a H₂O₂ koncentráció lehető legalacsonyabb szinten tartásának, hogy az enzimatis reakció során keletkezett peroxil gyököknek közel kellett lenniük a mintában található antioxidánsok koncentráció tartományához.

4.4.1.2. ECL esszé analitikai teljesítménye

Az optimalizált enzim-szubsztrát rendszer alkalmazásával tanulmányoztuk a Trolox kalibrátorokkal kapcsolatos fénykibocsátási kinetikát csöves luminométeren, a POD-ECL reagens injektálásával 5 párhuzamos meghatározással. A kalibrációs egyenest a görbe alatti terület értékei (AUC), valamint a lumineszcencia görbék első deriváltjainak adatai alapján állítottuk fel. A nagyobb számú ismétlések érdekében mindhárom párhuzamos mérés esetében 12 független kalibrációt végeztünk a lemezleolvasón a H₂O₂ szubsztrát injektálásával. Ezen adatokat az LOD meghatározásához is felhasználtuk. Az LOD-t úgy definiáltuk, mint a vak átlagos fénykibocsátása (AUC) átlag + 3 SD_{vak} értékből számított Trolox koncentráció. A csöves luminométeres módszer esetén az LOD érték 8,0 µM TE volt, míg a plate reader esetén 12,0 µM. A két mérés közötti különbség valószínűleg a csöves vizsgálatok jobb időfelbontásában rejlik. A legjobb illeszkedést és a legalacsonyabb LOD értéket az idő eltolódási módszerrel kaptuk, viszont ez csak akkor hasznos, ha lehetséges a finom

időfelbontás. A szakirodalomban a legszélesebb körben elfogadott módszer az időeltolódás értékelése, az időeltolódás során a fényjel 10%-os növekedése. Véleményünk szerint a fényemissziós görbe első deriváltja könnyebben kezelhető és akkor is használható, ha a minták maximális fénykibocsátási görbéi nem érik el a standardokét. A lemezleolvasón történő vizsgálatok során megvizsgáltuk ugyanabból az édesgyökér kivonatból származó TAC értékeket három egymást követő napon (stabilitás). A pontatlanság vizsgálatára a fentebb leírt biológiai mátrixrendszert használtuk. Az ECL módszer jó reprodukálhatóságot mutatott. Még 40 μM TE esetén sem haladta meg a pontatlanság a 8 % -os CV-t. Édesgyökér kivonatok alkalmazásával a linearitási és a visszanyerési tanulmányok is elfogadható analitikai teljesítményt mutattak. Ez azt jelenti, hogy a vizsgálat optimális mérési tartománya 30 és 100 μM TE között van. A módszer lineáris volt a 8-80 μM Trolox ekvivalensek tartományában, azonban a 8 és 40 μM közötti Trolox ekvivalens tartományban enyhe alámérés történt, ami tükröződik a regressziós egyenes egyenletében is. A visszanyerés elfogadható volt egy átlagos 6,2%-os alulbecsléssel 20-90 μM Trolox ekvivalens tartományban. Ahogy az a linearitási vizsgálat adatai alapján várható volt, a legmagasabb alámérés 40 μM TE alatt volt.

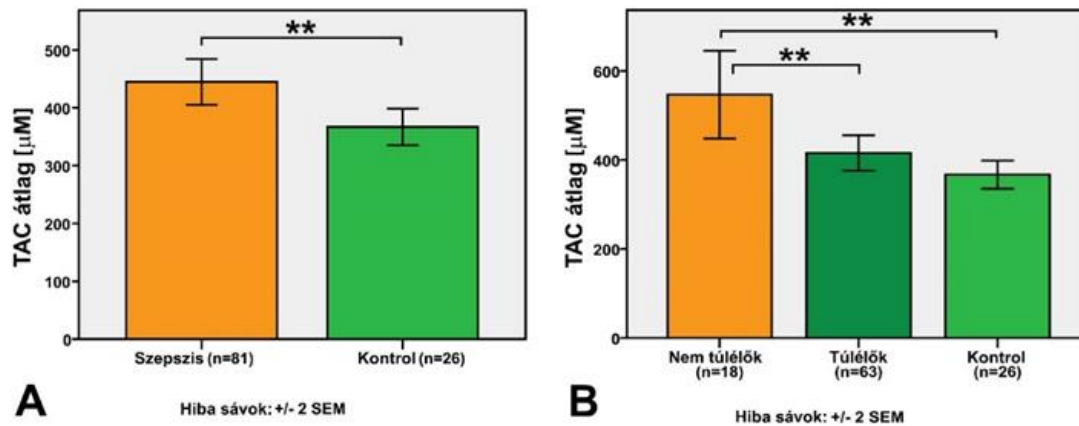
4.4.1.3. Módszerek összehasonlítása

10 különböző növényfaj etanolos kivonatát hasonlítottuk össze az ECL és a módosított ORAC módszerünk alkalmazásával. A TAC értékeket 1 g szárított növényre viszonyítottuk, minden faj és minden módszer esetében. Az ECL és ORAC vizsgálatok adatainak összehasonlítására Bland Altman és Passing Bablok analíziseket végeztünk. A Bland Altman analízis azt mutatta, hogy az ORAC és ECL módszerekkel nyert adatok különbségeinek átlaga 941,6 volt. Ennek tulajdonítható az a tény, hogy az ORAC esszé értéke átlagosan 941,6 egységgel ($\mu\text{mol/g}$) nagyobb, mint az ECL módszeré. A Bland Altman ábrázolás egyértelműen azt mutatja, hogy a kimutatható koncentrációk növekedésével a két alkalmazott módszerrel nyert adatok közötti különbségek is nőnek. Passing és Bablok regressziós egyenlete alapján az ORAC és az ECL módszerek között egy konstans és arányos különbség van.

4.4.1.4. Szeptikus betegcsoport TAC analízise.

A szeptikus betegcsoport TAC értékei szignifikánsan magasabbak voltak, mint a kontrol csoport esetén. Mi szignifikánsan magasabb TAC adatokat találtunk a nem túlélő csoportban, összehasonlítva a túlélők értékeivel, valamint a nem túlélőkben a kontrol csoporttal szemben is (7. ábra). Adataink jól korrelálnak az irodalomban leírtakkal. A kontrol és a szeptikus betegcsoport közötti, valamint a túlélő és nem túlélő csoportok közötti szignifikáns különbségek ellenére nem tudtunk kimutatni szignifikáns napi TAC változást a nyomon követett periódus ideje alatt. Adataink azt mutatják, hogy a teljes antioxidáns kapacitás

pozitívan erősen korrelál a szérumban lévő húgysavval és a kreatinin koncentrációkkal, valamint egy laza pozitív korrelációt tudunk kimutatni a TAC értékek és a hs-CRP szintje között.



7. ábra: A ECL módszerrel nyert szérumban lévő TAC értékek statisztikai elemzése szepszis és kontrol beteg csoportokban (A) és nem túlélő, túlélő, kontrol alcsoportokban (B). (**p < 0,01).

4.4.2. Három kávéfaj magjának és termésfalának TAC meghatározása

A kávékivonatok antioxidáns kapacitását három különböző módszerrel határoztuk meg (ECL, DPPH, ORAC). A vizsgálatunkba bevont mindhárom kávékivonatot (*Coffea arabica*, *Coffea benghalensis*, *Coffea liberica*) érett/éretlen magjából, valamint érett/éretlen termésfalából mért antioxidáns aktivitást tudtuk számszerűsíteni. Bár a kereskedelemben ritkán használják a *C. libericát*, a zöld magja hasonló antioxidáns aktivitással bír, mint a *C. arabica* és a *C. robusta*. Az ECL és DPPH módszerek esetén kapott 1 g szárított növényre vonatkoztatott Trolox ekvivalens (TE/g) értékek laza korrelációt mutattak ($R^2=0,587$, $p=0,083$, Student-féle t próba), míg az ORAC esszé esetén sokkal magasabb értékeket kaptunk, lényegesen egységesebb mintázattal, de ezek nem mutattak korrelációt a másik két módszer eredményeivel. Azonban a három vizsgálati eljárás pontatlansága elfogadható volt (ECL: $\leq 5\%$, DPPH: $\leq 10\%$, ORAC: $\leq 2\%$). A DPPH módszer során kapott adatokat %TAC/g formában fejeztük ki a korábban leírt egyenlet alapján. Az ECL módszerrel és a DPPH technikával kapott százalékban kifejezett antioxidáns kapacitás értékek viszonylag szoros korrelációt mutattak ($R^2=0,6107$, $p=0,161$, Student féle t-próba). A két módszer között a legnagyobb különbséget a *C. benghalensis* éretlen termésfala esetén tapasztaltuk, ahol a DPPH technika sokkal magasabb antioxidáns kapacitást mutatott, mint a kemilumineszcenciás módszer. Kísérleteink során minden esetben az ORAC esszé adta a legmagasabb értékeket, melyek nem korreláltak a másik két módszer eredményeivel. Érdekes, hogy a korábban publikált eredményekhez képest mi a *C. benghalensis* érett termés kivonatának antioxidáns aktivitását alacsonyabbnak találtuk, azonban az éretlen termésfal magasabb aktivitást mutatott a mi tanulmányunkban DPPH módszerrel

mérve. A vizsgált növények közül a libériai kávé érett termésfalának „scavenger” aktivitása volt a legjelentősebb.

5. Új megfigyelések

- Egyetlen sejt-életképesség paraméter mennyiségi meghatározása (pl.: intracelluláris ATP vagy észteráz aktivitás) gyakran félrevezető lehet.
- Bebizonyítottuk, hogy az észteráz-függő fluorogén próba, a CAM nem igazi életképesség paraméter, mivel az intracelluláris fluoreszcencia kialakulása nem ATP-függő folyamat.
- A calcein fluoreszcencia intenzitása inkább a sejtszámot tükrözi az életképesség helyett.
- A BCD, HPBCD vagy DIMEB egyidejű jelenléte nem módosította jelentősen a FIS vagy GER hatásait HepG2 sejtvonalon.
- A ZEA-val és BCD-vel együtt kezelt HepG2 sejteken a ZEA által kifejtett toxicitás hatékonyan csökkent.
- Szisztematikus szignifikáns különbséget állapítottunk meg az ECL és az ORAC vizsgálatok esetén kapott mérési eredmények között.
- Szignifikánsan magasabb TAC adatokat mutattunk ki a szepszist nem túlélő beteg csoportban, összehasonlítva a túlélők értékeivel, valamint a nem túlélőkben a kontrol csoporttal szemben is.
- A három kávéfaj antioxidáns kapacitásának meghatározása esetén az ECL és a DPPH esszék során kapott antioxidáns aktivitás értékek minden esetben laza korrelációt mutattak egymással, míg szorosabb összefüggés volt megfigyelhető az ECL technika és a DPPH módszer eredményei között.
- Az ORAC esszé minden esetben jóval magasabb Trolox ekvivalens értéket mutatott a másik két módszerhez képest.

6. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Kőszegi Tamás egyetemi tanárnak az útmutatásért és állandó fáradhatatlan munkájáért, segítőkészségéért. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kovács L. Gábornak és Prof. Dr. Miseta Attilának, a Laboratóriumi Medicina Intézet előző és jelenlegi vezetőinek, akik lehetővé tették, hogy munkámat intézetükben végezzem és mindig támogattak. Emellett kiemelt köszönettel tartozom Dr. Papp Nórának, a Farmakognóziai Intézet egyetemi adjunktusának a sok segítségért, támogatásért és, hogy lehetővé tette a növényi minták antioxidáns vizsgálatát. Köszönetet mondok Dr. Poór Miklósnak, a Gyógyszerhatástani Tanszék egyetemi tanársegédjének az áramlási citometriás mérésekben nyújtott segítségéért és a sikeres együttműködésekért. Továbbá köszönettel

tartozom a Laboratóriumi Medicina Intézet valamennyi munkatársának, akik közreműködtek és/vagy segítettek munkámat - közülük kiemelt köszönet illeti Györgyi Erzsébetet és Csepregi Ritát-, valamint az összes kooperációs partnerünknek. Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom kisfiamnak, férjemnek, szüleimnek, nagyszüleimnek, akik segítsége, támogatása és optimizmusa nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el.

7. Saját közlemények listája

Jelen PhD dolgozat alapjául szolgáló közlemények

Miklós Poór, Sándor Kunsági-Máté, **Nikolett Sali**, Tamás Kőszegi, Lajos Szente, Beáta Peles-Lemli: Interactions of zearalenone with native and chemically modified cyclodextrins and their potential utilization. *JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY*, 151 (2015): 63-68.

[IF:2,960]

Nikolett Sali, Sándor Nagy, Miklós Poór, Tamás Kőszegi: Multiparametric luminescent viability assay in toxicology models: a critical evaluation. *JOURNAL OF PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL METHODS*, 79 (2016): 45-55.

[IF: 2,390]

Éva Brigitta Patay, **Nikolett Sali**, Tamás Kőszegi, Rita Csepregi, Viktória Lilla Balázs, Tibor Sebastian Németh, Tibor Németh, Nóra Papp: Antioxidant potential, tannin and polyphenol contents of the seed and pericarp of three Coffea species. *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE*, 9 (4) (2016): 366-371.

[IF:0,925]

Tamás Kőszegi, **Nikolett Sali**, Maja Raknič, Zoltán Horváth-Szalai, Rita Csepregi, Marijana Zovko-Končić, Nóra Papp, Miklós Poór: A novel luminol-based enhanced chemiluminescence antioxidant capacity microplate assay for use in different biological matrices. *JOURNAL OF PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL METHODS*, 88:(2) (2017): 153-159.

[IF:2,238]

Nikolett Sali, Rita Csepregi, Tamás Kőszegi, Sándor Kunsági-Máté, Lajos Szente, Miklós Poór: Complex formation of flavonoids fisetin and geraldol with β -cyclodextrins. *JOURNAL OF LUMINESCENCE*, 194 (2018): 82-90.

[IF:2,686]

Jelen PhD dolgozat alapjául szolgáló könyvfejezet

Nikolett Sali, Tamás Kőszegi: Luminescent Techniques in tissue culture models In: Tamás Kőszegi, Antonella Chesca (szerk.), LABORATORY TECHNIQUES WITH APPLICABILITY IN MEDICAL PRACTICE. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing, 2015. pp. 77-99

Jelen PhD dolgozat alapjául szolgáló előadások és poszterek

N. Sali, T. Kőszegi: Luminescent viability methods using tissue culture models. *Second International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences* (Brassó, Románia, 2012.05.24.-2012.05.27.) [előadás]

N. Sali, T. Kőszegi: Multiparametric Luminescent Viability Studies. *The Third International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences „ IC-ANMBES 2014”* (Brassó, Románia, 2014.06.13-2014.06.15) [előadás]

N. Sali, T. Kőszegi: Validation of a fluorescent intracellular glucose test in cellular toxicology models. *Ceepus Summer School* (Portorož, Szlovénia, 2014.08.23-2014.08.29) [előadás]

N. Sali, R. Csepregi, M. Tóth, T. Dénes, A. Kaszás, S. Bartha, T. Kőszegi, N. Papp: Antioxidant activity of plants used in the Transylvanian ethnomedicine. *7th International Student Medical congress in Košice* (Kassa, Szlovákia, 2015.06.24.-2015.06.26.) [poszter]

A disszertációhoz szorosan nem kapcsolódó közlemények

Miklós Poór, Beáta Lemli, Mónika Bálint, Csaba Hetényi, **Nikolett Sali**, Tamás Kőszegi, Sándor Kunsági-Máté: Interaction of citrinin with human serum albumin. *TOXINS*, 7 (12) (2015): 5155-5166.

[IF:2,938]

Papp N, **Sali N**, Csepregi R, Tóth M, Gyergyák K, Dénes T, Bartha SG, Varga E, Kaszás A, Kőszegi T: Antioxidant potential of some plants used in folk medicine in Romania. *FARMACIA (BUCHAREST) &: p. &. (2017)*

[IF:1,348]

G.F. Horváth, Barbara Horváth, **Nikolett Sali** and R. Herczeg: Community-level response to different human disturbances and land use of small mammals in two marshland habitat patches in Hungary. *ARCHIVES OF BIOLOGICAL SCIENCES*, 64 (2) (2012): 613-628.

[IF:0,791]

Egyéb tudományos teljesítmény

Erasmus Intensive Course: Telemonitoring and telediagnostic for life sciences. (Brassó, Románia, 2013.05.12.-2013.05.25.)

Erasmus Lifelong Learning Programme: “Classic and modern methods for molecular diagnostics in human pathology (MDHP)” (Brassó, Románia, 2012.05.14-2012.05.25.)
Ceepus Summer School. (Portorož, Szlovénia, 2014. 08. 23.-2014.08.29.)