

# Alimentáris eredetű kísérletes zsírmáj és adjuváns kezelése természetes eredetű bioaktív hatóanyagokkal\*

Hegedüs Viktor dr.<sup>1, 4</sup> ■ Gerő Domokos dr.<sup>2</sup> ■ Mihály Zoltán dr.<sup>3</sup>  
Szijártó Attila dr.<sup>4</sup> ■ Zelles Tivadar dr.<sup>5</sup> ■ Sárdi Éva dr.<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, Gyógyszerész-tudományi Kar, Farmakognóziái Intézet, Budapest

<sup>2</sup>Cell Screen Applied Research Center, Budapest

<sup>3</sup>Szent János Kórház, Budapest

<sup>4</sup>Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. Sebészeti Klinika, Budapest

<sup>5</sup>Semmelweis Egyetem, Fogorvos-tudományi Kar, Budapest

<sup>6</sup>Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Genetika és Növénynevelés Tanszék, Budapest

A redox-homeosztázis változása a citokinek és szabad gyökök változásával jár és számos intracelluláris jelátviteli utat befolyásolhat különböző májbetegségekben. A liofilizált cékla+répa készítmény (*GPS Powder Kft. 1361/004/2003BFÁÉÉÁ*) bioaktív komponensei, mint például a betain, betaninok, betaxantinok, flavonoidok, polifenolok, glutamin,  $\beta$ -karotin, vitaminok és folsav megváltoztathatják a különböző sejtfolyamatokat. *Célok:* A szerzők célul tűzték ki a cékla+répa liofilizált készítmény bioaktív hatóanyagait védőhatásának vizsgálatát experimentális zsírmájban. *Módszer:* Hím Wistar patkányokat etettek standard és zsírdús táppal (a standard tápot kiegészítették 2% koleszterinnel, 0,5% kólsavval és 20% napraforgóolajjal) és a kezelt csoportoknak az etetéssel együtt 0,1 vagy 1 g/ttkg/nap természetes készítményt adagoltak. Az indukálható ciklooxigenáz-2 enzim, az indukált nitrogén-monoxid-szintetáz és a tumornekrózis-faktor- $\alpha$  mRNS-szinteket molekuláris-biológiai módszerekkel határozták meg. A szabad gyököket, a H-donor-aktivitást, a redukálóképességet és a szabad SH-csoport-koncentrációt luminometriás vagy spektrofotometriás eljárással mérték. A mobilizálható metilcsoportokat túlnyomós folyadék-kromatográfiával tanulmányozták. *Eredmények:* A nagyobb dózisú természetes készítmény jobban csökkentette az indukált szabadgyökreakciókat, az indukálható ciklooxigenáz-2 enzim, az indukált nitrogén-monoxid-szintetáz és tumornekrózis-faktor- $\alpha$  mRNS-szintjeit, mind egészséges májszövetben, mind zsírmájban. Bár a kezelés nem gyakorolt szignifikáns változásokat az összes globális antioxidáns-paraméterre, zsírmájban a kezelés után megnövekedett mobilizálható metilcsoport-koncentrációkat észleltek és kedvező tendenciát találtak a máj redox-homeosztázisában is. *Következtetések:* A vártan megfelelően a mérsékelt dózisú cékla+répa liofilizátum „funkcionális élelmiszernek” bizonyult az élelmi zsír által indukált experimentális zsírmájban. Lehetséges, hogy e kedvező hatás a klinikumban is hasznosulást nyerhet. *Orv. Hetil., 2011, 152, 1035–1042.*

**Kulcsszavak:** alimentáris eredetű zsírmáj, alacsony szintű szisztémás gyulladás, antioxidáns, bioaktív hatóanyag, cékla, immuntáplálás, redox-homeosztázis, szignáltranszdukció, táplálékkiegészítők

## Alimentary induced fatty liver and adjuvant therapy with effective natural bioactive molecules

Changes of redox-homeostasis generate cytokines, and free radicals influence many intracellular signaling pathways in different liver diseases. Liophilysed table beet and carrot powder (*GPS Powder Kft. 1361/004/2003BFÁÉÉÁ*) containing bioactive components such as betaine, betanins, betaxanthins, flavonoids, polyphenols, glutamine, beta carotene, vitamins and folic acid may produce changes various cellular pathways. *Aim:* The aim of this study was to determine the protecting effects of bioactive agents of the liophilysed table beet and carrot powder on fatty liver in a

\*A „Prof. Fehér János Emlékére” Alapítvány pályázatán díjat nyert munka.

“short term” experiment. *Method:* Male Wistar rats were fed with chow with or without high fat (2% cholesterol, 0.5% cholic acid, 20% sunflower oil) and treated with 0.1 or 1 g/bwkg/day natural product for ten days parallel with the feedings. Cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA levels were determined using molecular biologic methods. Free radicals, H-donating activity, reducing power and free SH-group concentrations were determined by luminometry and spectrophotometry. Mobilized methyl groups were assayed by over pressure liquid chromatography method in liver homogenates. *Results:* It was found that the higher dose of the natural product better decreased the induced free radical reactions, cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA-levels both in normal and fatty liver tissues. Although treatments failed to exert significant changes in all global antioxidant parameters, mobilized methyl group concentrations were higher after treatments in fatty liver. Favorable tendencies were also noted in the redox-homeostasis of the fatty liver after treatment. *Conclusions:* As expected, lyophilised table beet and carrot proved to be a “functional food” in rats with alimentary fat induced fatty liver. It cannot be ruled out that this beneficial effect may have clinical relevance. *Orv. Hetil.*, 2011, 152, 1035–1042.

**Keywords:** alimentary induced fatty liver, antioxidants, low grade systemic inflammation, bioactive agents, immunonutrition, redox homeostasis, signal transduction, dietary supplements

(Beérkezett: 2011. április 27.; elfogadva: 2011. május 16.)

### Rövidítések

AP-1 = aktivátor protein-1; ATBC = (Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study) Alfa-tokoferol/ $\beta$ -karotin hatását vizsgáló tanulmány; Bcl2-L1 = (B-cell lymphoma 2-like1) apoptózisindukáló faktor; CARET = (Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial)  $\beta$ -karotin és retinol hatását vizsgáló tanulmány; COX-2 = indukálható ciklooxygenáz-2 enzim; DPPH = 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil; EGF = (epidermal growth factor) hámeredetű növekedési faktor; G-CSF = granulocytakolónia-stimuláló faktor; GM-CSF = granulocytamonocytakolóniastimuláló faktor; HIF1- $\alpha$  = (hypoxia-inducible factor 1-alpha) hypoxiaindukált transzkripció faktor-1-alfa; ICAM-1 = (inter-cellular adhesion molecule-1) intercelluláris adhéziós molekula-1; JNK = c-Jun N-terminális kináz; MAPK = mitogénaktivált proteinkinázok; MCP-1 = (monocyte chemoattractant protein-1) monocyták kemotaktikus protein-1; MMP-1/-19 = (matrix metalloproteinase-1/-19) mátrixmetalloproteináz-1/-19; NAD<sup>+</sup> = nikotinamid-adenin dinukleotid oxidált forma; NADPH = nikotinamid-adenin dinukleotid-foszfát redukált forma; NASH = (nonalcoholic steatohepatitis) nem alkoholos steatohepatitis; NF- $\kappa$ B = (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) nukleáris faktor- $\kappa$ B; OPLC = (over pressured liquid chromatography) magas nyomású folyadékkromatográfia; PPAR- $\gamma$  = (peroxisome proliferator activated receptor) peroxisómáproliferátor-aktivált receptor; REF-1 = redoxfaktor-1; TLR = Toll-like receptor; TNF- $\alpha$  = tumornekrózis-faktor-alfa; VCAM-1 = (vascular cell adhesion protein 1) vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1

A táplálkozási eredetű zsírmáj korunk egyik vezető krónikus betegsége, amelynek latens fennállása miatt a betegek csak előrehaladott stádiumban kerülnek kezelésre. A napjainkra jellemző túlzott gyógyszerhasználat is fokozza a zsírmáj kialakulásának nagyobb kockázatát. Egyre nagyobb az igény a tartósan fennálló zsírmáj terápiás megoldása mellett a napi rutinban alkalmazható adjuváns terápiára. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a májat ért különböző metabolikus behatások következtében zsíros degeneráció alakul ki, amely oxidatív stressz

növekedéséhez vezet [1, 2]. Zsírmájban rendkívül romlik a szerv ischaemiástolerancia-ideje, azonban állatkísérletek során azt tapasztalták, hogy az ép májállomány ischaemia-reperfúzió miatt kialakult gyulladást aliméntáris eredetű bioaktív hatóanyagokkal mérsékelni lehet [3, 4, 5]. Eddig csak a nem alkoholos steatohepatitisnél (NASH) és az alkoholos zsírmájnál igazolták a gyulladáshoz vezető citokinek és a szabad gyökök által okozott károsodást [6]. Ismert, hogy NASH-ban a redoxszenzitív fehérjéken (hypoxiaindukált transzkripció faktor-1-alfa [HIF1- $\alpha$ ], redoxfaktor-1 [REF-1], p53) és transzkripció faktorokon (nukleáris faktor- $\kappa$ B [NF- $\kappa$ B] és aktivátor protein-1 [AP-1]) keresztül a jelátviteli utak megváltoznak és további proinflammatorikus citokinek (interleukin-1 és 6 [IL-1, IL-6], TNF- $\alpha$ ) termelése önmagát gerjesztő módon, alacsony szintű szisztémás gyulladást eredményez [7]. A Toll-like receptorok (TLR) a NF- $\kappa$ B igen fontos aktivátorai, és a legújabb kutatások szerint e receptoroknak a szabad zsírsavak az egyik legfontosabb ligandjaik [2]. Az elhízást és érelmeszesedést okozó egészségtelen és túlzott mértékű zsírdús táplálékok fogyasztását már sokan tanulmányozták, azonban nem vizsgálták a gyulladáshoz vezető paraméterek megjelenését és a táplálkozási eredetű biológiailag aktív molekulák, fémek hatásait az aliméntáris zsírmájra. Ezért kutatásaink célja az volt, hogy molekuláris biológiai és biokémiai módszerekkel megvizsgáljuk az alacsony szintű gyulladás jelenlétét patkányban kiváltott zsírmájban, továbbá felmérjük a cékla+répa liofilizált kivonat hatását a zsírmáj regressziójára.

### Anyagok és módszerek

A liofilizált cékla+répa por (GPS Powder Kft. No.1361/004/2003BFÁÉÉ) a GPS Powder ajándéka volt. A készítmény számos bioaktív hatóanyagot tartalmaz, amelyek közül jelentősek a betaxantin, betacianin, betain, glutamin, B<sub>1</sub>-, B<sub>6</sub>- és C-vitamin, folsav, polifenolok, fla-

vonoidok,  $\beta$ -karotin, valamint a kálium, magnézium és vas [8, 9].

A laboratóriumi vizsgálatokhoz használt hidrogén-peroxid, luminol, mikroperoxidáz, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) a SIGMA (Amerikai Egyesült Államok), szérum bovin-albumin a Calbiochem AG (Svájc) cégektől származtak. A Silica gél 80 F254 vékonyréteg-lemez a Mercktől (Németország), míg a többi analitikai tisztaságú vegyszert a Reanal-tól szereztük be (Budapest). A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz felhasznált vegyületeket, reagenseket a módszerleírásnál részletezzük.

## Állatkísérletes modell

A kísérletben 200–250 g-os hím Wistar patkányokat használtunk. Hat csoportot hoztunk létre, amelyek mindegyike 10-10 állatot tartalmazott. Az állatokat a Biofarm Promt Kft.-től vásároltuk (BFP, Gödöllő, Magyarország). Az I., II. és III. csoport hagyományos tápot kapott, míg a IV., V. és VI. csoport zsírdús (2% koleszterinnel, 0,5% kólsavval és 20% napraforgóolajjal dúsított táp) etetésben részesült. A II-es és V-ös csoport a tápjukba kevert 0,1 g/ttkg cékla + répa liofilizátumkezelésben, míg a III. és VI. csoport szintén a tápjukba kevert 1 g/ttkg cékla+répa kezelésben részesült [10].

## Kísérleti protokoll

Az állatok mély narkózisát 100 mg/ttkg ketaminnal biztosítottuk. Laparotomia után az állatok vérét a vena cava inferioron keresztül aspiráltuk, és citrátos csőben szeparáltuk. Az állatok máját molekuláris biológiai és redoxparaméter vizsgálatokhoz készítettük elő. Ezenkívül a májmintákból meghatároztuk a kötöttformaldehid-koncentrációkat is.

## Molekuláris biológiai mérések

### RNS-izolálás és cDNS-előkészítés

A gyorsfagyasztott májmintákat (körülbelül 100 mg) Trizol reagensben homogenizáltuk (Invitrogen, Carlsbad, CA), majd RNS-izolálást végeztünk. A homogenizálás után az oldhatatlan anyagot 10 percig 12 000 G-n centrifugálással eltávolítottuk, majd fenol-kloroformos extrakciót végeztünk. Az RNS-t a vizes fázisból 0,8 ml isopropranolollal vontuk ki. Az így kapott nukleinsavprecipitátumot ismét 75%-os alkoholban mostuk. Az RNS-t dietil-pirokarbonát oldatban feloldottuk (DEPC, Biomol GmbH, Hamburg), majd  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az RNS-meghatározás Qanti-IT RNS fluoriméterrel és Qubit fluoriméterrel történt (Invitrogen, Carlsbad, CA). Az RNS-integritást formaldehid agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. 100  $\mu\text{l}$  reakcióelegyben, 10  $\mu\text{g}$  teljes RNS-t használtunk a reverztranszkriptáz reakcióhoz,

amelyhez nagy kapacitású Archive kitet használtunk a gyártó utasításai szerint (Applied Biosystems, Foster City, CA). Az RNS degradációjának csökkentésére, a cDNS-szintézis reakciójánál, 100 egység RNáz-t adtunk a reakcióelegyhez. A reverztranszkriptáz reakciója  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 120 perig tartott iCycler Thermal Cyclerben (Biorad, Hercules, CA), majd a mintákat  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

### Real-time PCR

Az iNOS, COX-2 és TNF- $\alpha$  mRNS mennyiségét Taqman assay-vel határoztuk meg. Kontrollként minden egyes reakcióban GAPDH gént használtunk. A primereket és TaqMan-mintákat, amelyeket patkány gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz számára fejlesztettek ki (GAPDH, TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents) az Applied Biosystemstől szereztük be. Minden egyéb primert és mintát a Metabion International AG-től vásároltuk (Martinsried, Németország). A TaqMan minták 5' végét (FAM: 6-karboxi-fluoreszcein) és 3' végét (TAMRA: 6-karboxi-tetrametil-rodamin) fluoreszcens jelzőfestékekkel jelöltük meg.

A következő primer és mintaszekvenciákat használtuk: COX-2 előrehaladó primer: 5'-AGT-CTC-TCA-ATG-AGT-ACC-GC-3', COX-2 reverz primer: 5'-GCA-GCC-ATT-TCT-TTC-TCT-CC-3', a vizsgált COX-2-szekvencia: 5'-AAC-GAT-GTG-TAA-GGT-TTC-AGG-GAG-AAG-CG-3', iNOS előrehaladó primer: 5'-AAC-TCG-GGC-ATA-CCT-TCA-GG-3', iNOS reverz primer: 5'-TCG-ATG-TCA-TGA-GCA-AAG-GC-3', a vizsgált iNOS-szekvencia: 5'-TAC-ATG-CTG-GAG-CCC-AGG-CCA-AAT-AC-3', a TNF- $\alpha$  előrehaladó primere: 5'-CAC-CAC-GCT-CTT-CTG-TCT-AC-3', TNF- $\alpha$  reverz primer: 5'-ATG-AGA-GGG-AGC-CCA-TTT-GG-3', a keresett TNF- $\alpha$ -szekvencia: 5'-CTT-GTT-GGG-ACC-GAT-CAC-CCC-GAA-GG-3'. A PCR során képzett másolatok 25  $\mu\text{l}$ -es reakcióterében létrejött cDNS-ek szintetizálódtak, amelyek mintegy 200 ng hozzáadott RNS-ből, 12,5  $\mu\text{l}\times 2$  Sensimix passzív jelzőfestékkel (ROX) ellátott dT-ből álltak (Quantance Ltd., London, UK). Az oldat végső, 5,5 mM koncentrációját  $\text{MgCl}_2$  biztosította. A reakcióelegy minden egyes előrehaladó és reverz primerből 2,5 pmol-t, valamint a vizsgált szekvenciából 5 pmol-t tartalmazott. Ezen kétlépéses PCR (Taqman assay) esetén kezdeti 10 perces,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os denaturálás szükséges a hot-start enzim miatt, majd az ezt követő mintegy 40 ciklus során már 15 másodperc is elég  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Az annealing (primer, probe bekötés) és extenzió (amplikon szintetizálás) egyszerre történik,  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os 1 perces inkubálás után (Stratagene, La Jolla, CA). Az amplifikációt poolozott cDNS-mintákkal és MxPro analitikai programmal ellenőriztük, amely a becsült számolási értéket hasonlítja össze a kapott relatív kópiaszámmal (Stratagene, La Jolla, CA). Minden egyes mRNS-transzkriptumot a GAPDH-szint mérésével határoztunk meg, és a kapott értékeket átlagoltuk.

## Biokémiai mérések

### Redukálóképesség meghatározása

A redukálóképességet *Oyaizu* módszere szerint határoztuk meg 700 nm-en spektrofotometriás eljárással. Referenciavegyületként aszkorbinsavat használtunk. A minta redukálóképességét aszkorbinsav-ekvivalensben (ASE) adtuk meg. Egy aszkorbinsav-ekvivalens az egységnyi térfogatú minta (1 ml) redukálóképessége, ha hatása egyenértékű 1  $\mu$ mol aszkorbinsavval [11].

### H-donor-aktivitás meghatározása

A H-donor-aktivitást *Blois* módszerének kis módosítása alapján 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil stabil gyök jelenlétében mértük 517 nm-en spektrofotometriás eljárással. Az eredményt a gátlás százalékában adtuk meg. Gátlás % =  $[\text{Abs}(\text{kontroll}) - \text{Abs}(\text{minta})] / \text{Abs}(\text{kontroll}) \times 100$  [12].

### Szabad szulfhidrilcsoportok meghatározása

*Ellman* és *Lysko* módszere szerint határoztuk meg a szabad szulfhidrilcsoportok koncentrációját. 5,5-ditiobisz-nitrobenzoesav reagenssel pH 7,4 Na-foszfátpufferben 512 nm-en. Standardként redukált glutationt alkalmaztunk [13].

### Diénkonjugátum-koncentráció meghatározása

A májhomogenizátumok lipidtartalmát izooktánnal (1 g/5 ml) extraháltuk, majd 20 óra elteltével a levegőtől elzárt szobahőmérsékletű minták diénkonjugátum-tartalmát 232 nm-en az AOAC útmutatása szerint határoztuk meg [14].

### Kemiluminometriás mérések

Az összscavenger-kapacitás meghatározására kemiluminescenciás módszert alkalmaztunk *Blázovics és mtsai* szerint [9]. A reakcióelegy hidrogén-peroxidot, luminolt és mikroperoxidát tartalmazott. A mérés elve az, hogy a luminol szabad gyökök hatására gerjesztődik és fényt bocsát ki, amelyet luminométerben lehet detektálni. A fényintenzitás csökkenthető gyökfogó molekulák hatására. Az eredményeket relatív light unit (RLU) értékekben adtuk meg.

### Fehérjetartalom meghatározása

A fehérjetartalmat *Lowry* módszerével határoztuk meg fotometriásan 650 nm-en, standardként bovin szérumalbumint alkalmaztunk. Az eredményeket mg/ml-ben adtuk meg [15].

## Túlnyomásos rétegekromatográfia

A formaldehid dimedonnal képzett addukt (formalde-meton) mérésére kromatográfiás eljárást alkalmaztunk [16]. A májhomogenizátumokat dimedonnal kezeltük (0,07% dimedon-metanol), majd az oldatot 1500 g-on centrifugáltuk és a felülúszót használtuk fel a kromatográfiás szeparáláshoz [17]. A kromatográfiás meghatározást TLC-60 F245, bevont szilikagél lemezen végeztük. A futtatóoldat kloroform-metilénklorid (35/65, v/v) volt. A minták denzitometriás elemzését Shimadzu CS-930 TLC/HPTLC szkennelrel (Shimadzu Co., Kiotó, Japán) végeztük el  $\lambda = 265$  nm-en.

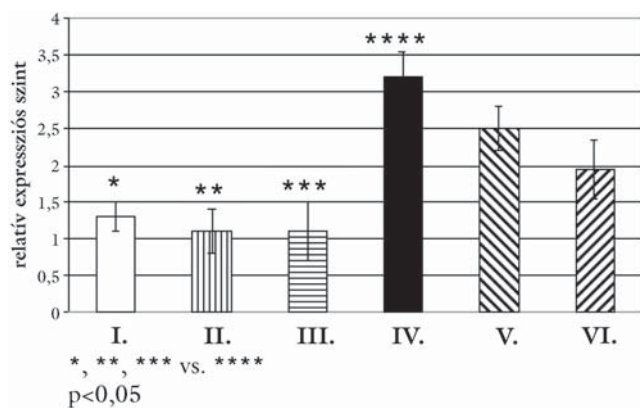
## Statisztikai analízis

A statisztikai kiértékeléshez Statistika 7.0 programot használtunk.

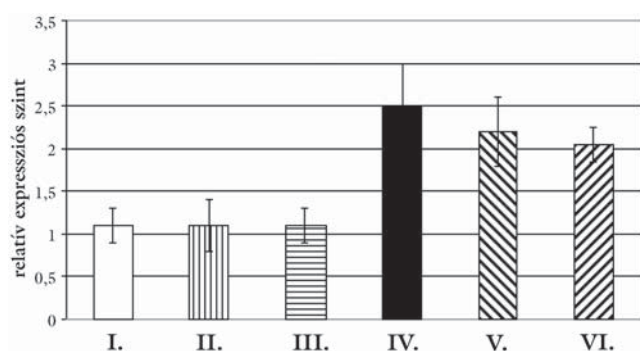
## Eredmények

A 10 napig alkalmazott zsíretetés okozta zsírmájban alacsony szintű gyulladást igazoltunk, amelyet mind a molekuláris biológiai vizsgálatok eredményei (COX-2-mRNS, TNF- $\alpha$ -mRNS és az iNOS-mRNS-szintek), mind a szabad gyökös paraméterek (indukálható szabadgyök-szint, diénkonjugátum-koncentráció) szignifikáns növekedése és a globális antioxidáns-paraméterek (redukálóképesség, szabad-SH-csoport) változása is megerősített (1–6. és 8. ábra). A máj redukáló ekvivalensben bővelkedik a 10 napig tartó zsíretetés miatt, ezért megnövekedett redukálóképesség-értékeket és H-donor-aktivitást találtunk. Ezzel szemben a fehérjék szabad-SH-koncentrációja kisebb volt, mint az egészséges állapotokban, jelezve, hogy a fehérjeszintézis, így az antioxidáns enzimvédelem is károsodott. A zsírmájban alkalmazott különböző dózisu (0,1 mg/ttkg; 1 mg/ttkg) céklakezelés tendenciaszerű gyulladáscsökkenést okozott, ami mind az mRNS-, mind a szabadgyök-szintekben megjelent (1–5. ábra). A redukálóképesség a zsírdús diétán tartott csoportokban a vártan megfelelően megemelkedett a valószínűsíthetően megnövekedett NADPH/NAD<sup>+</sup> arány miatt. Sem a redukálóképességben, sem a H-donor-aktivitásban lényeges eltérést nem mértünk, noha a 0,1 g/ttkg dózisu céklakezelés a zsírdús tápon tartott csoportok értékeiben kisebb ingadozásokat eredményezett (6. és 7. ábra).

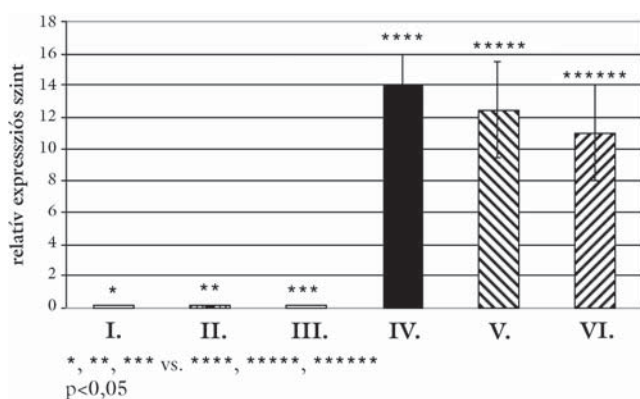
Érdekes összefüggést találtunk a májhomogenizátumokban mért szabad-SH-csoport és a kötött formaldehid (mobilizálható metilcsoport) szintje között, amelyek a céklakezelések hatására zsírmájban szinkron növekedtek, azonban a normáltápon tartott, de 1 g/ttkg céklával kezelt csoportban a várttal ellentétes hatást mutattak a transzmetilálóképességben a két diétás csoport között (8. és 9. ábra).



1. ábra | A májhomogenizátumban mért indukált COX-2 mRNS-szintje a különböző kezelések hatására



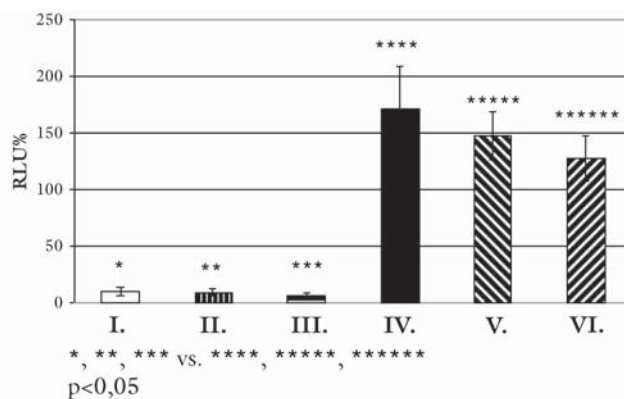
2. ábra | A májhomogenizátumban mért TNF- $\alpha$  mRNS-szintje a különböző kezelések hatására



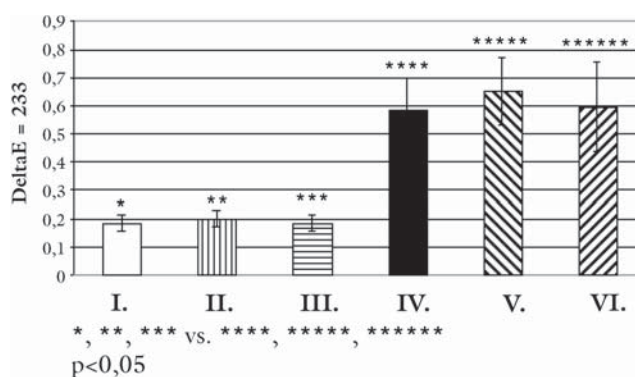
3. ábra | A májhomogenizátumban mért iNOS mRNS-szintje a különböző kezelések hatására

### Megbeszélés

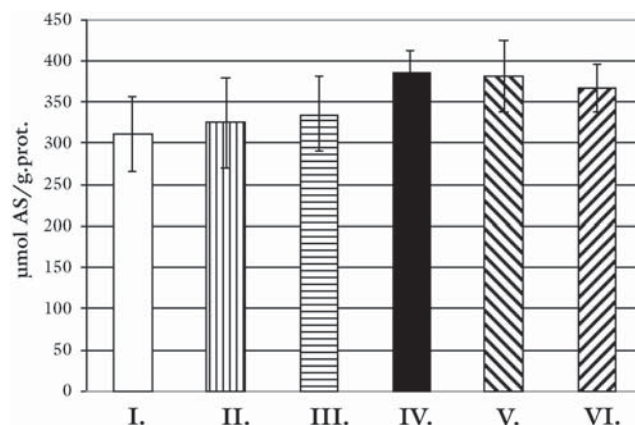
Az alkoholos és nem alkoholos eredetű zsírmáj patomechanizmusa széles körben kutatott, és a biokémiai, immunológiai, szövettani, valamint az újabb molekuláris biológiai vizsgálatok egyértelműen igazolták a betegségben fennálló gyulladást, a vele járó szabad gyökök reakciók felerősödését és a szervezet antioxidáns védelmének fokozatos csökkenését, amely végül májcirrhosis kialakulásához vezethet [18, 19]. A táplálkozási eredetű zsírmáj tankönyvi adatok szerint reverzibilis és a helyes



4. ábra | A májhomogenizátumban mért szabadgyök-szint RLU%-ban kifejezve a különböző kezelések hatására

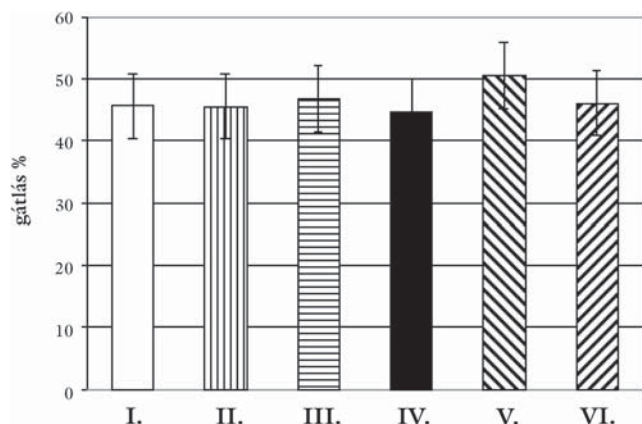


5. ábra | A májhomogenizátumban mért diénkonjugátum-koncentráció változása a kezelések hatására

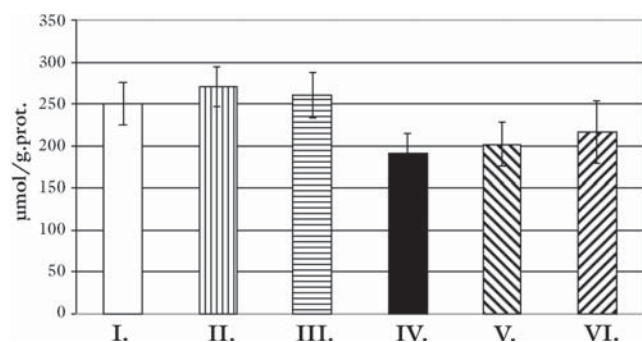


6. ábra | A májhomogenizátumban mért redukálóképesség változása a különböző kezelések hatására

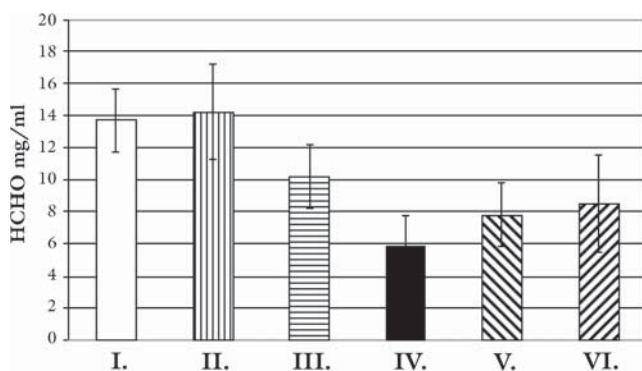
életmódra váltással gyógyulhat. Az egészségtelen táplálkozás okozta elhízás és az ezzel járó zsírmáj incidenciája egyre növekvő tendenciát mutat már a fiatalabb populáció körében is. Úgy tűnik, hogy a megroggyúlt étkezési szokások, vagy inkább a megroggyúlt kínálat nem teszi lehetővé a helyes táplálkozást bizonyos néprétegek számára. Feltételezhető, hogy a hosszan tartó alimentáris eredetű zsírmájban – hasonlóan a patkánykísérletünk-



7. ábra | A májhomogenizátumban mért H-donor-aktivitás változása a különböző kezelések hatására



8. ábra | A májhomogenizátumban mért szabad-SH-csoport mennyisége a különböző kezelések hatására



9. ábra | A májhomogenizátumban mért transzmetiláló képesség változása a különböző kezelések hatására

ben igazolt mérsékelt fokú gyulladáshoz – enyhe szisztémás gyulladás alakul ki, amely elhízott egyéneknél növelheti a metabolikus X-szindróma kialakulásának nagyobb esélyét. A fogyókúrák nem vagy alig segítenek, ezért egyre nő az igény olyan optimális adjuváns kezelésekre, amelyek alimentáris eredetű zsírmájban mérsékelhetik, illetve megállíthatják a már kialakult negatív folyamatokat. Nemzetközi és hazai tanulmányok, valamint saját kutatásaink alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a természetes bioaktív hatóanyagokban és nyomelemekben gazdag étrend-kiegészítő terápia számos betegségben nemcsak szükséges és nélkülözhetetlen

a redox-homeosztázis fenntartásához, hanem veszélyeket is rejthet magában, különösen elhízott betegek esetében [20, 21]. A legújabb kutatások szerint az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor szabályozza a különböző citokinek (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), kemokinek (IL-8, monocita kemotaktikus protein-1 [MCP-1]), sejtadhéziós molekulák (vascularis adhéziós molekula-1 [VCAM-1], intercelluláris adhéziós molekula-1 [ICAM-1]) és növekedési faktorok (granulocita-monocita kolóniasztimuláló faktor [GM-CSF], granulocytakolónia-stimuláló faktor [G-CSF]) génjeinek átírását, a proinflammatorikus gének közül az indukált nitrogén-monoxid-szintetázét, valamint a hőszokkfehérjék közül a szuperoxid-dizmutázét (SOD), amely ismert antioxidáns enzim. Ezáltal az NF- $\kappa$ B-szint szignifikáns növekedése szoros kapcsolatban áll a fokozott immunválasszal és gyulladási reakcióval [22, 23, 24, 25]. A „short term”, kísérletes alimentáris eredetű zsírmájban tapasztalt szabadgyök-változások, a lipidperoxidáció fokozódása és a proinflammatorikus citokinek megnövekedett termelése egybeesnek a megállapítással, hogy a TNF- $\alpha$  szignifikáns növekedését egy önmagát gerjesztő folyamat okozza [26]. A zöldségek, gyümölcsök olyan biológiailag aktív kis molekulákat (vitaminokat, polifenolokat, flavonoidokat és egyéb fontos molekulákat) tartalmaznak, amelyek optimális esetben kedvezően befolyásolhatják a jelátviteli utakat, ezáltal az öngerjesztő gyulladási folyamatokat gátolhatják [27]. Más vegyületek, mint például a betain, fontos metiláló ágens, és nagyban hozzájárul a stabil „metil pool” kialakulásához. A betainkezelést már nem alkoholos steatohepatitises betegnél is alkalmazták és megállapították, hogy szignifikánsan javult a betegek ASAT- és ALAT-szintje, valamint kisebb volt a gyulladás, a kezdődő fibrosis mértéke is [28, 29]. A táplálékkal felvett nyomelemek a redox-homeosztázis nélkülözhetetlen komponensei, mind az oxidatív károsodások, mind az antioxidáns védelmi vonal nélkülözhetetlen alkotói. Az utóbbi évek kutatásai alapján a cékla „funkcionális élelmiszernek” számít, mert élettani szempontból fontos vegyületei antioxidáns tulajdonságukon túl számos metabolikus utat, sőt, magát a jelátvitelt is befolyásolják. Bár a pontos mechanizmusok nem ismertek, saját eredményeink is ezt erősítik meg [30, 31]. A polifenollokkal történő kezelés az NF- $\kappa$ B gátlásán keresztül a sejtciklus deregulációját és apoptózist okozza tumorsejtekben [32]. A fenolos típusú antioxidánsok képesek befolyásolni a mitogén-aktivált proteinkináz (MAPK) szignálmolekulákat is, amelyek az apoptózist kezdeményező gének indukációjához vezetnek [33]. A MAP-kinázok (c-Jun N-terminális kináz [JNK] és p38-utak) részt vesznek az NF- $\kappa$ B transzkripciós aktivitásában [34]. Irodalmi adatok bizonyítják, hogy a polifenolok antioxidáns vagy prooxidáns tulajdonsága között dózis-hatás összefüggés van, amely a sejtciklusra is kihat. Az A-vitamin és az aktív retinoid metabolitok teratogén, tumorogén hatása összefüggésbe hozható e molekulák génszabályozásban betöltött szerepével [35]. Az E-vitamin az újabb kuta-

tások szerint részt vesz számos gén szabályozásában [36]. Ezek közé tartoznak például a citokróm P450 (CYP3A) gének, a CD36, az MMP-1/-19 (mátrixmetalloproteináz-1 és -19), E-szelektin, ICAM-1, integrinek, citokinek, valamint a peroxiszómaproliferátor-aktivált receptor (PPAR- $\gamma$ ), a ciklin-D1, ciklin-E, apoptózis-indukáló faktor (Bcl2-L1), p27 és CD95 (Apo-1/ Fas ligand) génjei is. A C-vitamin és az E-vitamin génszintű hatásaiban sok hasonló vonás fedezhető fel [37, 38]. A C-vitamin antioxidáns és prooxidáns hatása egyaránt érvényre jut a szervezetben. In vivo állatkísérletekben az antioxidánsok, illetve kombinált alkalmazásuk, szinergikus hatás révén, jóval effektívebben hatnak a szignáltranszdukciós utakra, mint monoterápiában alkalmazva [21]. Több epidemiológiai tanulmány, mint például a  $\beta$ -karotin és retinol hatását vizsgáló CARET vagy az alfa-tokoferol, illetve  $\beta$ -karotin hatását vizsgáló ATBC nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket [39, 40]. A kezelések több ember halálát okozták, figyelemmel a ma indokolatlanul alkalmazott táplálékkiegészítők veszélyeire is. A céklával kapcsolatos eddigi kutatások alapján megállapítható volt, hogy az egészséges állati szervezet jól tolerálja a kis dózisu kezeléseket, de az is ismertté vált, hogy taxánkezelt metasztatikus prosztatarákos betegeknél alkalmazott cékla kiegészítő kezelés csak a betegek 60%-ában volt biztonságosan alkalmazható, míg 40%-uknál a hámeredetű növekedési faktor (EGF) szignifikáns emelkedése felhívta a figyelmet a tumorprogresszió lehetőségére [2, 41]. Ez az újabb adat is felhívja a figyelmet a körültekintő és megfontolt kezelési stratégiákra. E hatás hátterében feltételezhető a cékla folsav- és jelentős vastartalmának kontraindikált hatása tumoros betegekben, ezért a táplálkozási faktorok emelt dózisban történő alkalmazása orvosi felügyeletet igényel [20]. A glutaminban gazdag cékla alkalmas lehet arra – az egyéb körülmények figyelembevételével –, hogy a más vegyületek által kiváltott túlzott mértékű apoptózist mérsékelje, ezáltal megóvja a szervezetet az indokolatlan energiavesztéstől vagy a sejtek aponekrózistól, illetve a szöveti nekrozistól, különösen a kritikus állapotú szeptikus betegek esetében, vagy a jövőben elektív májműtétek kapcsán [42, 43]. Az általunk alkalmazott kísérletes zsírmájmodellben a cékla + répa liofilizátumban található polifenolok, vitaminok, glutamin, betain és más bioaktív ágensek, valamint a nyomelemek csökkentették az alacsony szintű gyulladásban részt vevő COX-2-, iNOS- és TNF- $\alpha$ -mRNS-szinteket és a szabad gyökös folyamatokat, fokozták az antioxidáns-aktivitást, valamint javították a máj transzmetilációs képességét. Ezek alapján a cékla „funkcionális élelmiszernek” tekinthető zsírmájjal járó kórállapotokban.

## Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak *Bárkovits Saroltának* a kiváló technikai segítségért. A kutatásokat a Semmelweis Egyetem Doktori Iskola 2/1 PhD-program, az ETT 002/02 program és a GPS-Powder Ltd. támogatta.

## Irodalom

- [1] Yu, L. E., Schwimmer, J. B., Lavine, J. E.: Non-alcoholic fatty liver disease: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and treatment. *Paed. Child Health*, 2010, 20, 26–29.
- [2] O'Rourke, R. W.: Inflammation in obesity-related disease. *Surgery*, 2009, 145, 255–259.
- [3] Selzner, M., Clavien, P. A.: Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Sem. Liv. Dis.*, 2001, 21, 105–113.
- [4] Váli, L., Stefanovits-Bányai, É., Szentmihályi, K. és mtsai: Liver-protecting effects of table beet (*Beta vulgaris* var. rubra) during ischemia-reperfusion. *Nutrition*, 2007, 23, 172–178.
- [5] Su, J. F., Guo, C. J., Wei, J. Y. és mtsai: Protection against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats by oral pretreatment with quercetin. *Biomed. Environ. Sci.*, 2003, 16, 1–8.
- [6] Mantena, S. K., King, A. L., Andring, K. K. és mtsai: Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. *J. Rad. Biol. Med.*, 2008, 44, 1259–1272.
- [7] Byrne, C. D.: Fatty liver: Role of inflammation and fatty acid nutrition. *Prost. Leuk. and Ess. Fatty Acids*, 2010, 82, 265–271.
- [8] Hájos, M.: Colour components of different table beet varieties. *Int. J. Hort. Sci.*, 1999, 5, 3–4.
- [9] Hájos, M., Csikkel-Szolnoki, A., Kiss, A. S.: Mineral content of table beet roots as depending on varieties. *Magnesium Res.*, 2000, 12, 326–327.
- [10] Blázovics, A., Fehér, E., Fehér, J.: Role of free radical reactions in experimental hyperlipidemia in the pathomechanism of fatty liver. In: *Free Radicals and Liver*. Eds: Csomós, G., Fehér, J. Springer-Verlag, Berlin, 1992, 98–126.
- [11] Oyaizu, M.: Studies on products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.*, 1986, 44, 307–315.
- [12] Blázovics, A., Kovács, A., Lugasi, A. és mtsai: Antioxidant defence in erythrocytes and plasma of patients with active and quiescent Crohn's disease and ulcerative colitis: A chemiluminescent study. *Clin. Chem.*, 1999, 45, 895–896.
- [13] Sedlak, J., Lindsay, R. H.: Estimation of total protein bound and non protein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Anal. Biochem. Biophys.*, 1985, 25, 192–205.
- [14] AOAC Official methods of analysis 28054 B. AOAC, Arlington, 1984.
- [15] Lowry, A. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. és mtsai: Protein measurement with the Folin-phenol reagents. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265–275.
- [16] Gersbeck, N., Schönbeck, F., Tyihák, E.: Measurement of formaldehyde and its main generators in *Erysiphe graminis* infected barley plants by planar chromatographic techniques. *J. Planar Chromatogr.*, 1989, 2, 86–89.
- [17] Sárdi, É., Tyihák, E.: Simple determination of formaldehyde in dimedone adduct form in biological samples by high performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.*, 1994, 8, 313–314.
- [18] Charlton, M.: Nonalcoholic fatty liver disease: a review of current understanding and future impact. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2004, 2, 1048–1058.
- [19] Ratzin, V., Bonyhay, L., Di Martino, V. és mtsai: Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis. *Hepatology*, 2002, 35, 1485–1493.
- [20] Szentmihályi, K., Kéry, Á., Then, M. és mtsai: Potassium-sodium ratio for the characterization of medicinal plant extracts with diuretic activity. *Phytother. Res.*, 2000, 12, 163–166.
- [21] Szentmihályi, K., Blázovics, A., Lugasi, A. és mtsai: Effect of natural polyphenol-type antioxidants (*Sempervivum tectorum* and *Raphanus sativus* L. var. niger extracts) on metal ion concentrations in rat bile fluid. *Curr. Topics in Bioph.*, 2000, 24, 203–207.
- [22] Meyer, M., Schreck, R., Bacuerle, P. A.: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 in intact

- cells: AP-1 as secondary antioxidant responsive factor. *EMBO J.*, 1993, 12, 2005–2015.
- [23] *Surb, Y. H., Chun, K. S., Cha, H. H. és mtsai:* Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mut. Res. Fund. Mol. Mech. Mut.*, 2001, 480–481, 243–268.
- [24] *Rui, T., Kviety, P. R.:* NF- $\kappa$ B and AP-1 differentially contribute to the induction of Mn-SOD and eNOS during the development of oxidant tolerance. *FASEB J.*, 2005, 19, 1908–1910.
- [25] *Baker, R. G., Hayden, M. S., Ghosh, S.:* NF- $\kappa$ B, inflammation and metabolic disease. *Cell Metabolism*, 2011, 13, 11–22.
- [26] *Mibály, Z., Hegedüs, V., Gerő, D. és mtsai.:* Bioactive agents against systemic low-grade inflammation. *Z. Gastroenterol.*, 2008, 5 (Suppl.), 503.
- [27] *Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B. és mtsai.:* Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann. Ist. Super Sanita.*, 2007, 43, 394–405.
- [28] *Abdelmalek, M. F., Angulo, P., Jorgensen, R. A. és mtsai.:* Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Am. J. Gastroent.*, 2001, 96, 2711–2717.
- [29] *Sárdi, É., Tordai, E.:* Determination of fully N-methylated compound in different cabbage and beetroot varieties. *Act. Biol. Szeg.*, 2005, 49, 43–45.
- [30] *Nyirády P., Sárdi E., Bekő G. és mtsai.:* A *Beta vulgaris* L. ssp. *esculenta* var. *rubra* bioaktív vegyületeinek hatása metasztatikus prosztatarákban. *Orv. Hetil.*, 2010, 151, 1495–1503.
- [31] *Blázovics, A.:* Redox homeostasis, bioactive agents and transduction therapy. *Curr. Sign. Transd. Ther.*, 2007, 2, 226–239.
- [32] *Ahmad, N., Gupta, S., Mukhtar, H.:* Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor- $\kappa$ B in cancer cells versus normal cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, 376, 338–346.
- [33] *Kong, A. N., Yu, R., Lei, W. és mtsai.:* Differential activation of MAPK and ICE/Ced3 protease in chemical-induced apoptosis: The role of oxidative stress in the regulation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) leading to gene expression and survival or activation of caspases leading to apoptosis. *Restor. Neurol. Neurosci.*, 1998, 12, 63–70.
- [34] *Ramachandiran, S., Huang, Q., Dong, J. és mtsai.:* Mitogen activated protein kinases contribute to reactive oxygen species-induced cell death in renal proximal tubule epithelial cells. *Chem. Res. Toxicol.*, 2002, 15, 1635–1642.
- [35] *Rietjens, I. M., Boersma, M. G., Haan, L. és mtsai.:* The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Env. Tox. Pharm.*, 2002, 11, 321–333.
- [36] *Zingg, J. M., Azzi, A.:* Non-antioxidant activities of vitamin E. *Curr. Med. Chem.*, 2004, 11, 1113–1133.
- [37] *Calfee-Mason, K. G., Spear, B. T., Glauert, H. P.:* Vitamin E inhibits hepatic NF- $\kappa$ B activation in rats administered the hepatic tumor promoter, phenobarbital. *J. Nutr.*, 2002, 132, 3178–3185.
- [38] *Bowie, A. G., O'Neill, L. A.:* Vitamin C inhibits NF- $\kappa$ B activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Immunol.*, 2000, 165, 7180–7188.
- [39] *Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D. és mtsai.:* Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the beta-carotene and retinol efficacy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1996, 88, 1550–1559.
- [40] *The Alpha-Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study Group:* The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N. Engl. J. Med.*, 1994, 330, 1029–1035.
- [41] *Váli L., Stefanovits-Bányai É., Hájos M. és mtsai.:* Cékla táplálkozásélettani hatása a duodenumra májműtét során patkányban. In: *Proceedings of The 11th Symposium on Analytical and Environmental Problems.* Szerk.: Galbács Z., Vass L., Szeged, 2004, 9–13.
- [42] *De-Souza, D. A., Greene, L. J.:* Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine. *Crit. Care Med.*, 2005, 33, 1125–1135.
- [43] *Melis, G. C., Wengle, N., Boelens, P. G. és mtsai.:* Glutamine: recent developments in research on the clinical significance of glutamine. *Curr. Op. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2004, 7, 59–70.

(Hegedüs Viktor dr.,  
Budapest, Üllői út 26., 1085  
e-mail: viktol19@yahoo.com)

## Tisztelt Olvasónk!

Kórházak, egészségügyi intézmények,  
tudományos társaságok  
**szakmai és továbbképző programjait,**  
az egészségüggyel, az orvostudománnyal  
kapcsolatos **pályázatok felhívásait,**  
**ösztöndíj-felhívásait** és  
a kórházak, az egészségügyi intézmények  
**pályázati hirdetményeit**  
kedvezményes áron tudjuk közölni lapunkban.

**Szódíj: 25 Ft + áfa**  
**Előfizetőink hirdetésait**  
**70 szó terjedelemben térítésmentesen**  
**jelentetjük meg.**

A hirdetés megrendelhető e-mailen,  
a [Budai.Edit@akkr.hu](mailto:Budai.Edit@akkr.hu) címen.

A számla kiegyenlítése átutalással vagy  
a kiadó által küldött csekk befizetésével lehetséges.