

**A bél-máj tengely jelentősége a májbetegségek patomechanizmusában – kísérletes és humán tanulmányok**

–  
*Nem-invazív markerek vizsgálata és klinikai alkalmazhatósága májbetegségekben*

Doktori tézisek

**Dr. Egresi Anna**

Semmelweis Egyetem  
Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők:

Dr. Hagymási Krisztina, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Lengyel Gabriella, Ph.D., med. habil., egyetemi docens

Konzulens:

Dr. Blázovics Anna D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Szöllősiné Dr. Varga Ilona, C.Sc., egyetemi docens

Dr. Iliás Ákos, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Nagy Péter, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Kuczyné Dr. Folhoffer Anikó, Ph.D.,  
egyetemi adjunktus

Dr. Lugasi Andrea, habil, Ph.D., főiskolai  
tanár, dékán

Budapest

2022

## 1.Bevezetés

A különböző kóreredetű krónikus májbetegségek napjainkban jelentős egészségügyi terhet jelentenek világszerte. 2017-ben 1,5 milliárd ember volt érintett krónikus májbetegségben, 60% nem alkoholos zsírmájbetegségben, 29% hepatitis B vírus, 9% hepatitis C vírus okozta fertőzésben és 2% alkoholos májbetegségben szenvedett. A májat érő különböző károsító hatások miatt kóros májműködés jön létre, amelynek egyik stádiuma a májelzsírosodás. A májkárosodás következő eleme a gyulladásos aktivitás fokozódása a májparenchymában. A zsírsav-felhalmozódás a mikroszomális monooxigenázrendszer serkentése révén szabadgyök-felszabadulást eredményez. A reaktív oxigén gyökök fokozott felszabadulása lipidperoxidációhoz, proteindenaturációhoz, DNS-károsodáshoz vezet. A különböző gyulladásos mediátorok, többek között a TNF- $\alpha$ , az IL-1, -6, -10, -12 és az INF- $\gamma$ , valamint a nagyérzékenységű C-reaktív fehérje, fokozzák a májkárosodást. Az idült májkárosodás a májállomány kötőszövetes átépüléséhez vezet, amely dinamikus folyamat, állandó re- és progrediálás jellemzi.

Az egészséges bél-mikrobiota nagymértékben felelős a gazdaszervezet általános egészségéért. Világszerte előtérbe került a bél-máj tengely vizsgálata. A máj, mint másodvonalbeli tűzfal, védi a szervezetet a bélből bekerülő patogének és az általuk termelt endotoxinok (lipopoliszacharidok) ellen. A bélfal eltérései miatt gyakran megváltozik a táplálékból történő bioaktív vegyületek, antioxidáns vitaminok, polifenolos vegyületek, pl. flavonoidok, antocianinok, - melyek eredeti molekulaformájukban egyébként is rosszul szívódnak fel -, illetve ásványi anyagok felvétele és hasznosulása. Különböző

gombafajok (Aspergillus, Penicillium, és Fusarium) által termelt másodlagos metabolitok, ún. mikotoxinok képesek mikotoxikózist okozni emberekben és állatokban. A mikotoxikózis részeként zavart szenved a természetes bélflóra is. A legújabb felismerések szerint a mikotoxinok és a bél mikrobiota között kétirányú kapcsolat áll fenn. A bélflóra képes természetes módon eliminálni a mikotoxint a gazdaszervezetből, illetve a mikotoxinok befolyásolják a bél mikrobiom összetételét.

A májszövetből történő mintavétel, szövettani feldolgozás jelenleg a különböző kórereditű krónikus májbetegségek meghatározásának arany standardja. A mintavétel akadályai miatt szükség van egyéb, úgynevezett nem-invazív, fájdalomtalan, szövődmenymentes, olcsó, megismételhető diagnosztikai módszerekre. Az elmúlt évtizedekben számos nem-invazív eljárás vált elérhetővé a májfibrózis mértékének jellemzésére, mint a fibrózis szérumbiomarkerei, valamint különböző radiológiai vizsgálómódszerek.

## **2. Célkitűzés**

1. Állatkísérlet során vizsgáltuk a mikotoxinnal szennyezett étrend májkárosító hatását, és a Silybum marianum hepatoprotektív gyógynövény komplex szerepét rutinlaboratóriumi, redox-homeosztasiszt jellemző és szövettani vizsgálatokkal.

2. Retrospektív tanulmányunkban, gyulladással járó bélbetegségben, colitis ulcerosában szenvedő betegeknel vizsgáltuk a nem invazív biomarkerként alkalmazható redox-paraméterek változásait.

3. Prospektív, kohorsz, humán vizsgálatban célul tűztük ki olyan megbízható jelzőmolekula, pontrendszer, vagy diagnosztikus algoritmus létrehozását és validálását, amely

segítséget nyújtana a fibrosisstádium megítélésére, valamint lehetővé tenné a progresszió monitorozását különböző etiológiájú idült májbetegségben.

4. A redox-homeosztázist jelző markerekkel vizsgáltunk különböző, ökológiai és konvencionális gazdálkodásból származó joghurtmintákat (in vitro) abból a célból, hogy ki tudjuk választani a legmagasabb antioxidáns kapacitással rendelkező joghurtokat mind a hagyományosan előállított, mind a biojoghurtok közül humán tanulmányunkhoz.

5. Klinikai pilot study keretében vizsgáltunk egy bélflórát módosító táplálkozási faktor szerepét az NAFLD kiegészítő kezelésében. Különböző biomarkerekkel (rutinlaboratóriumi, immunbiokémiai, redox- és testösszetétel paraméterek) tanulmányoztuk az ökológiai és a hagyományos módon előállított joghurtok hatását, a hatásuk között fennálló különbség lehetőségét.

6. Új, egyszerű, az oxidatív stresszt jelző protein karbonil csoportok meghatározására alkalmas fluorimetriás módszert kívántunk kidolgozni.

### **3. Módszerek**

#### ***3.1. Mikotoxikózis, valamint a máriatövis protektív hatása a máj redox- homeosztázisára állatkísérletben***

Tanulmányunkban tizennyolc fehér, magyar kacsát (életkor: 47 nap, átlagos testtömeg: 2288 g) vizsgáltunk. Az állatokat véletlenszerűen 3 csoportba (n = 6/csoport) osztottuk. Az első csoport normál takarmányt, a második csoport mikotoxinnal szennyezett kukoricát kapott (4,9 mg/kg DON és 0,66 mg/kg F-2 toxin). A harmadik csoportba tartozó takarmányhoz, amely mikotoxint tartalmazott a fentiekkel megegyező

koncentrációban, máriatövis préselményt (*Silybum marianum*) (0,5%) adtunk.

### ***3.2. Bél-máj tengely összefüggéseit vizsgáló retrospektív tanulmány gyulladásoos bélbetegségben - betegek beválogatási kritériumai***

Retrospektív tanulmányunkban 100 mérsékelt aktivitású (Montreali klasszifikáció S2) colitis ulcerosában szenvedő (ffi=46, nő=54), 2000-2004 közötti időszakban kezelt beteg (átlagéletkor:  $42,5 \pm 12,7$  év) adatait értékeltük újra a bél-máj tengely szempontjából. Az adatokat korban illesztett egészséges kontrolllok (N=42) (ffi=17, nő=25) (átlagéletkor:  $40,2 \pm 13,5$  év) eredményeivel hasonlítottuk össze.

### ***3.3. Nem invazív pontrendszerek alkalmazása krónikus májbetegségben szenvedőknél - betegek beválogatási kritériumai***

A vizsgálatba, tájékozott beleegyezést követően, 88 beteget vontunk be (férfi = 36, nő = 52, átlagéletkor =  $49,1 \pm 14,7$  év), akik különböző etiológiájú krónikus májbetegségben szenvedtek (HCV = 10, HBV = 6, HCV / HBV = 1, NAFLD / NASH = 41, ALD = 19, AIH = 11). A betegeknel rutinlaboratóriumi, redox-homeosztázist jelző paraméterek, citokinszintek kerültek meghatározásra, valamint shear wave elasztográfiás mérést végeztünk.

### ***3.4. Joghurtfogyasztás vizsgálata NAFLD-ben szenvedő betegeknel klinikai pilot study keretén belül - betegek beválogatási kritériumai***

Vizsgálatunkba 37 (férfi = 21, nő = 16, életkor =  $51,73 \pm 11,82$  év) NAFLD-ben szenvedő beteget vontunk be (testsúly= $89, \pm 15,5$  kg, BMI= $31,61 \pm 5,4$  kg/m<sup>2</sup>) tájékozott beleegyezést követően. A vizsgálat kezdetén mind a 37 betegnel kóros májenzimszinteket mértünk,

ultrahangvizsgálattal zsírmáj ábrázolódt, és hepatológiai gondozás alatt álltak.

A betegeket véletlenszerűen két csoportra osztottuk. Az első csoport (n=21fő) ökológiai eredetű joghurtot; a második csoport hagyományos joghurtot (n=16fő) fogyasztott. A vizsgálat során mindkét csoportban naponta 300 g joghurtot fogyasztottak 8 héten keresztül. A résztvevők vénás vérvétele háromszor történt a vizsgálat időtartama alatt (a joghurt fogyasztása előtt, a 8-hetes joghurtfogyasztás végén és 12 héttel a befejezést követően).

### **3.5. Shear wave elasztográfiás vizsgálat**

A májfibrozis mértékét 2D shear wave elasztográfiás módszerrel határoztuk meg. A máj tömörségét (LS) a rugalmasság medián értékeivel mértük Toshiba ultrahang-készülékkel (Toshiba Aplio 500, Toshiba Medical Systems, Japán).

### **3.6. Laboratóriumi vizsgálatok**

#### **3.6.1. Nem invazív pontrendszerek**

A rutin laboratóriumi paraméterek felhasználásával a következő szerológiai pontszámokat számítottuk:

<b>AAR</b> = AST / ALT (U/l)
<b>APRI</b> = [(AST / AST <sub>normál tartomány felső határa</sub> ) × 100] / vérlemezkeszám (10 <sup>9</sup> /l)
<b>GAPRI</b> = (GGT / GGT <sub>normál tartomány felső határa</sub> / vérlemezkeszám) × 100
<b>Fib-4</b> = [Életkor (év) × AST (U/l)] / [vérlemezkeszám (10 <sup>9</sup> /l) × √ALT (U/l)]
<b>GUCI</b> = AST (U/l) x INR x 100 / vérlemezkeszám (× 10 <sup>9</sup> /l)
<b>Fibrosis index</b> = 8,0-0,01 x vérlemezkeszám (10 <sup>9</sup> /l) - Albumin (g/l)
<b>FRT</b> = 3,31 + életkor x 0,09 + APRI x 1,5 + ALP (U / L) x 0,4 - albumin (g/l) x 0,14

#### **3.6.2. Citokinek meghatározása**

Négy citokin, a TNF-alfa, az IL-6, a leptin és az adiponektin plazmaszintjét ELISA kitekkel (Sigma-Aldrich®) mértük a gyártó utasításai szerint.

### ***3.6.3. Redox homeosztázist jelző markerek meghatározása joghurt-, humán vér- illetve kacsák májmintáiban***

#### ***3.6.3.1. Szabad szulfhidrilcsoport meghatározása***

A szabad szulfhidrilcsoportot Ellman és Lysko módszerével határoztuk meg 5,5'-ditiobis-nitro-benzoésav reagenssel Na-foszfát pufferben (pH 7,4) 512 nm-en. Standardként redukált glutationt használtunk.

#### ***3.6.3.2. Hidrogén-donáló képesség meghatározása***

A H-donor-aktivitást Blois módszerének kis módosítása alapján 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil stabil gyök jelenlétében mértük 517 nm-en spektrofotometriásan.

#### ***3.6.3.3. Indukált szabadgyök-szint meghatározása***

A kemilumineszcenciás mérésnél csekély mennyiségű humán plazmából (0,15 ml), vörösvértestből (0,05 ml), joghurtmintából (0,05ml) illetve májhomogenizátumból (0,05ml) történt a vizsgálat.

#### ***3.6.3.4. Polifenoltartalom meghatározása joghurtmintákban***

A joghurtminták polifenol-tartalmát Singleton és Rossi módszere szerint mértük. A minták abszorbanciáját 760 nm-en határoztuk meg Hitachi U-2000 spektrofotométerrel.

#### ***3.6.3.5. Redukálóképesség meghatározása kacsamájmintákban***

A redukálóképességet Oyaizu módszerével mértük a májmintákban. Az abszorbanciát 700 nm-en határoztuk meg, és a redukálóképességet összehasonlítottuk az aszkorbinsav standard görbéjével.

#### ***3.6.3.6. Lipidperoxidációs markerek meghatározása kacsamájmintákban***



Az indukált malondialdehid (MDA) szinteket spektrofotometriásan mértük a májhomogenizátumokban módosított Ottolenghi módszerével. A májmintákban a dién-konjugátumok koncentrációját izooktánnal (1 g minta/5 ml izooktán) történő extrakcióval határoztuk meg AOAC leírásának megfelelően.

#### **3.6.3.7. Protein-karbonil meghatározás**

A vérminták szeparálása után, a vérplazma mintákat 10x hígítottuk PBS-sel (7,2 pH). Minden biológiai anyag esetében meghatároztuk a teljes fehérjekoncentrációt. A protein-karbonil tartalmat DNPH kittel (Sigma-Aldrich®) mértük a gyártó utasításai szerint. Az abszorbanciát 375 nm-en spektrofotométerrel detektáltuk.

Az NBDH (7-hidrazino-4-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazol) módszer a karbonilcsoportokkal való reakcióján alapul, a hidrazonképződés során erősen fluoreszcens termékek alakulnak ki. A hígított mintákhoz (100 $\mu$ l) 100 $\mu$ l NBDH oldatot (10 mM) adtunk, és a fluoreszcenciát 15 perc után Jasco FP 6300 fluoriméteren (Japán) mértük.

#### **3.6.4. Fémelemanalízis**

A méréseket Spectro Genesis szimultán ICP – OES spektrométerrel és CCD detektor rendszerrel (Kleve, Németország) végeztük. Egyes fémeket (króm, szelén) a humán mintákban induktív csatolású plazma tömegspektrometriával (iCAP Q, ICP-MS) (Thermo Fisher Scientific, USA) is megvizsgáltunk.

#### **3.6.5. Testösszetétel-mérés**

A klinikai pilot study-ba bevont betegek testösszetételét bioelektromos impedancia elvén alapuló módszer segítségével háromszor mértük (joghurtfogyasztás előtt, a 8-hetes joghurtfogyasztás befejezésekor, és 12 héttel a

joghurtfogyasztás befejezése után). Meghatároztuk a teljes testvíz-, a fehérje-, az ásványianyag-tartalmat, a testzsír- és a vázizomtömeget, a BMI-t, a testzsírszázalékot, a visceralis zsírt, az alapanyagcserét, a derék-csípő arányt, és a testsejt-tömeget InBody, (USA) készüléssel.

### **3.7. Engedélyek**

A Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatási Regionális és Intézményi Bizottsága jóváhagyta a Helsinki nyilatkozat szerint elvégzett humán tanulmányokat. TUKEB engedélyek száma: 24/1996 (2005-ben megújítva), 13/2016, 145/2016. IKEB 3944/2004. Az összes, állatokkal történő eljárás összhangban volt az állatok védelmével és gondos kezelésével kapcsolatos (40/2013. (II.14.)) Magyar kormányrendelettel, és az állatkísérletet az Intézményi Állatjóléti Bizottság hagyta jóvá.

### **3.8. Statisztikai analízis**

Az eredmények statisztikai kiszámításához Statistica 13.2 szoftvercsomagot (StatSoft Inc., Tulsa, USA) használtunk. A változók eloszlásának normalitását Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors és Shapiro-Wilks teszttel ellenőriztük. Az adatok statisztikai értékelését Student-féle t-teszttel, egyirányú ANOVA LSD post hoc tesztjével és a Kruskal-Wallis teszt után végzett többszörös összehasonlítással végeztük. Az összes tesztben a statisztikai szignifikancia szintjét  $p < 0,05$ -re állítottuk.

## **4. Eredmények**

### ***4.1. Mikotoxikózis, valamint máriatövis protektív hatása a máj redox- homeosztázisára állatkísérletben***

A mikotoxinnal szennyezett étrendet kapó csoport májmintáinak szövettani vizsgálata során a hepatocyták citoplazmájának vakuoláris degenerációját, magányos májsejt-elhalást, valamint a mononukleáris fagocitarendszer egy-egy sejtjének nekrotikus sejthalálát találtuk. Egyes helyeken limfociták és histiocyták intersticiális beszűrődéseket és enyhe intersticiális fibrosist is megfigyeltünk. A máriatövissel is kezelt csoportban a vacuoláris degeneráció közepes fokú volt. A DON és F-2 toxinnal szennyezett táp fogyasztása csökkentette a malondialdehid (MDA) és a dién konjugátum (DC) koncentrációját a kacsamáj-homogenizátumban a normál diétát fogyasztó csoporthoz képest. A szabad szulfhidril tartalom szignifikánsan megemelkedett ( $p < 0,005$ ) a mikotoxinnal szennyezett tápot fogyasztó 2. csoportban ( $0,72 \pm 0,06$ ), és tovább emelkedett a máriatövissel kezelt csoportban ( $0,77 \pm 0,11$ ) a normál étrendű csoporthoz képest ( $0,41 \pm 0,04$ ). A redukálóképesség megemelkedett a kezelt két csoportban a normál étrendet fogyasztó állatokhoz képest, a máriatövis-kiegészítés tovább fokozta a redukálóképességet a májszövetben. A kemilumineszcencián alapuló mérés gyökfogó kapacitás növekedést mutatott a két kezelt csoportban a normál étrendet fogyasztó állatokhoz képest ( $2,11 \pm 0,97$ ). Ez a hatás azonban csak az első és a máriatövist is fogyasztó csoport között volt szignifikáns ( $0,66 \pm 0,39$ ) ( $p < 0,05$ ). A fémelem-analízis során emelkedett alumínium- ( $0,71 \pm 0,45$ ), kalcium- ( $24,64 \pm 6,33$ ), réz- ( $38,30 \pm 11,25$ ) és vasszinteket ( $117,48 \pm 34,78$ ) észleltünk mindkét kezelt

csoporthoz képest. A magnézium ( $48,35 \pm 10,85$ ), a mangán ( $1,45 \pm 0,39$ ), a foszfor ( $1137,99 \pm 174,63$ ), a kén ( $627,72 \pm 138,80$ ) és a cink ( $16,63 \pm 2,14$ ) koncentrációja csökkent a normál étrendet fogyasztó állatokhoz képest ( $p < 0,001$ ).

#### ***4.2. Bél-máj tengely összefüggéseit vizsgáló retrospektív tanulmány gyulladásoos bélbetegségben***

A rutin májfunkciós paraméterek vizsgálata során a referenciatartományon belül emelkedett szinteket találtuk a gamma-glutamil-transzpeptidáz és az alkalikus-foszfataz tekintetében, azonban szignifikáns különbség nem volt a kontrollcsoporthoz képest. Az öszszantioxidáns státusz (TAS) szignifikáns ( $p < 0,05$ ) csökkenését tapasztaltuk colitis ulcerosában (N=42) az egészséges kontrollcsoportokhoz (N=7) képest. A redukálóképesség értékek szintén szignifikáns mértékben változtak, a betegcsoportban magasabb értékeket kaptunk. (kontroll: N=38, CU: N=100), ( $p < 0,001$ ). A hidrogén-donáló képesség nem különbözött szignifikánsan a két csoportban. (kontroll: N=38, CU: N=100), ( $p = 0,78$ ). A glutation-peroxidáz enzim aktivitásának csökkenését tapasztaltuk a betegcsoportban (kontroll: N=38, CU: N=42), ( $p = 0,09$ ). Emelkedett szuperoxid-dizmutáz szinteket mértük a kontrollcsoportokhoz képest ( $p = 0,34$ ) (kontroll n=38, colitis ulcerosán =42).

Az indukált kemilumineszcencia mértéke szignifikánsan alacsonyabb volt a betegcsoportban. (erythrocyta: kontroll: N=38, CU: N=93, ( $p < 0,001$ ); plazma: kontroll: N=38, CU:N=97), ( $p < 0,001$ ). Colitis ulcerosában (N=75) az epesavszint tendenciózusan kisebb értéknek adódott ( $p = 0,06$ ).

#### ***4.3. Nem invazív pontrendszerek vizsgálata krónikus májbetegségben szenvedőknél***

A betegeket a shear wave elasztográfiára meghatározott stádiumbesorolás szerint csoportosítottuk (cut-off pontok: F0-F1 <7kPa, F2 7-9,5kPa, F3 9,5-12 kPa, F4 >12kPa). A betegek 46%-át F0-F1 stádiumba soroltuk (nem vagy csak csekély mértékű fibrózis), a szignifikáns fibrózis prevalenciája 21% volt, a betegek 33%-a 3. és 4. stádiumba került. Vizsgáltuk továbbá a markerek, pontszámok változását szignifikáns májfibrózisban (F2-F4) normál májszövethez képest (F0-F1). Szignifikáns korreláció volt a különböző fibrosisstádiumok között az AAR, az APRI, a GUCI, a FiB-4 és a GAPRI nem invazív fibrosis pontszámok tekintetében. Nem találtunk szignifikáns különbséget az FRT és a fibrosisindex tekintetében a csoportok között.

Megmértük négy citokin (adiponektin, leptin, IL-6 és TNF-alfa) koncentrációját a plazmában. Nem volt szignifikáns különbség a májfibrózis alapján elkülönített csoportok között, de az F2-F4 csoportokban az adiponektin, az IL-6 és a leptin értékei általában magasabbak voltak, mint az F0-F1-ben. A plazma hidrogén-donáló képessége nem szignifikáns módon ( $p = 0,098$ ) nagyobb volt az F2-F4 csoportban. Az erythrocytákban mért, hosszabb időtartamot jellemző paraméter szabadgyök-fogó kapacitás nem mutatott különbséget a csoportok között (F0-F1 =  $21,04 \pm 8,44$ , F2 =  $16,4 \pm 10,9$ , F3 =  $21,8 \pm 11,6$ , F4 =  $20,29$  Gátlás%). Nem találtunk különbséget a plazmában mért, indukált kemilumineszcenciával meghatározott oxidatív stresszt jelző paraméterrel. A vörösvértestekben mért érték az F3 és F4 csoportokban enyhe emelkedést mutatott az F2-hez viszonyítva. A szabad szulfhidrilcsoport-tartalom, mint antioxidáns paraméter szignifikánsan alacsonyabb volt az F2-F4 csoportokban, mint az F0-F1 ( $p = 0,0021$ ) stádiumokban.

Az enyhe vagy nem kimutatható fibrózisban (F0-F1) és a súlyos fibrózisban szenvedő betegek (F4) közötti különbség szintén statisztikailag szignifikánsnak mutatkozott ( $p = 0,01$ ).

#### ***4.4. Joghurtfogyasztás vizsgálata NAFLD-ben szenvedő betegeknél klinikai pilot study keretén belül***

##### ***4.4.1. Ökológiai és hagyományos gazdálkodásból származó joghurtok in vitro összehasonlítása redox-homeosztázis markerekkel***

A klinikai vizsgálat megkezdése előtt a kiskereskedelmi forgalomban kapható számos joghurt közül kiválasztottunk 6, hasonló beltartalmi paraméterekkel rendelkező, ugyanakkor eltérő forrásból származó élőflórás joghurtot. Redox-homeosztázist jelző markerekkel vizsgáltunk három, ökológiai és három, konvencionális gazdálkodásból származó joghurtmintát. Vizsgáltuk 3 fajta hagyományos módon előállított (Natúr joghurt – Mizo, Activia – Danone, Natúr joghurt – Danone) és 3 fajta ökológiai gazdálkodásból (Bio Wiesenmilch Naturjogurt – Kärntnermilch, Natur aktiv biojoghurt - Aldi, Zöldfarm Bio natúr joghurt – Naszálytej) származó, kiskereskedelmi forgalomban lévő, probiotikus joghurt redox-tulajdonságait.

Az antioxidáns rendszert jellemző hidrogén-donáló képesség szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) magasabb volt az ún. biojoghurtokban, mint a hagyományos termékekben. Kiemelendő azonban, hogy az Activia konvencionális joghurt hidrogén-donáló képessége hasonlóan alakult a biojoghurtokéval, némelyiket meg is haladta.

Szignifikánsan alacsonyabb indukált szabadgyök-szinttel rendelkeztek a bio-joghurtok ( $p < 0,05$ ). A konvencionális

joghurtok közül egy fajta (Mizo) kiemelkedően magas szabadgyök-szintet mutatott, míg a biojoghurtok közül a Wiesenmilch rendelkezett a legalacsonyabb értékkel.

A szabad szulfhidritartalom nem szignifikáns módon magasabb volt a konvencionális joghurtokban, mint a biojoghurtokban. Hasonlóan a hidrogén-donáló képesség mérésénél is az Activia konvencionális joghurt mutatott magas hidrogén-donáló kapacitást.

A termékekben mért polifenoltartalom nem különbözött az eltérő módon előállított joghurtok között, azonban a Wiesenmilch bio és a Mizo konvencionális joghurtokban kimagasló polifenoltartalmat mutattunk ki. Az összes redox-tulajdonságaik miatt a klinikai pilot vizsgálatba ezt a két joghurtot választottuk ki.

#### ***4.4.3. Joghurtfogyasztás hatása NAFLD-ben szenvedő betegek laboratóriumi, antropológiai valamint klinikai paramétereire***

Élelmiszerek rövid távú hatásának vizsgálata során nem feltétlenül várható szignifikáns hatás, de ennek ellenére lehet különbség a kétféle joghurt fogyasztása között. A 8-hetes joghurtfogyasztás után a májenzimszintek kedvezőtlenül mérsékelten emelkedtek (AST:33,29→39,44 U/l,  $p=0,71$ ; ALT:47,72→57,44 U/l,  $p=0,15$ ; GGT:101,91→126,58 U/l,  $p=0,83$ ; ALP:101,51→110,75 U/l,  $p=0,65$ ), majd a joghurtfogyasztás után 12 héttel a kezdeti állapotra csökkentek. A bilirubin- és az összkoleszterinszint lényegében nem változott, azonban az LDL-szint (64,47%-ról 63,64%-ra,  $p=0,08$ ) és a trigliceridek (1,85→1,78 mmol/l,  $p=0,11$ ) mérsékelt csökkenését tapasztaltuk a 8-hetes kezelés befejezését követően. A vas (17,8→15,98 $\mu$ mol/l,  $p=0,23$ ) és a cink (12,42→11,98 $\mu$ mol/l,  $p=0,32$ ) szintje minimálisan

csökkent, a réz enyhén emelkedett közvetlenül joghurtfogyasztás után ( $16,52 \rightarrow 17,31 \mu\text{mol/l}$ ,  $p=0,09$ ). Kismértékű D-vitamin-szint ( $20,25$ -ről  $25,74 \text{ ng/ml}$ -re a bio,  $25,17$ -ről  $26,67 \text{ ng/ml}$ -re a konvencionális csoportban) növekedést találtunk ( $p=0,03$ ). A két csoportban főként az adiponektinszint változásának tendenciája különbözött. Az adiponektin és a leptin szintje megnövekedett közvetlenül a joghurt fogyasztása után a „hagyományos csoportban” ( $n=16$  fő). Ezzel szemben a 8 hetes kezelés után az „ökológiai csoportban” ( $n=21$  fő) az adiponektin szint szignifikáns csökkenését ( $12017,57$ -ről  $8833,5 \text{ pg / ml}$ -re,  $p=0,03$ ) tapasztaltuk. A TNF-alfa ( $52,06 \pm 49,78 \rightarrow 61,93 \pm 58,67 \text{ pg/ml}$ ,  $p=0,54$ ) és IL-6 ( $37,42 \pm 35,89 \rightarrow 19,48 \pm 18,11 \text{ pg/ml}$ ,  $p=0,67$ ) szintek nem változtak szignifikánsan a kezelés hatására, illetve a mért értékek nagy szórást mutattak.

Az indukált szabadgyök-szint statisztikailag alacsonyabb volt ( $p=0,02$ ) a joghurt fogyasztása után közvetlenül, a „hagyományos” ( $n=16$  fő) és a „bio” csoportban egyaránt ( $n=21$  fő), majd tovább csökkent a 12 hetes utánkövetéskor ( $p=0,01$ ), amely kedvező. Az antioxidáns védekező képességet jelző szabad szulfhidriltartalom ( $0,38 \rightarrow 0,4 \text{ mmol/l}$ ) és hidrogén donáló képesség ( $27,5 \rightarrow 28,04 \text{ Gátás\%}$ ) minimálisan változott a kezdeti állapothoz képest. A testösszetételben nem találtunk szignifikáns különbségeket a kezelés után.

#### ***4.5. Új, egyszerű módszerek fejlesztése a májfibrozis stádiumának nem invazív megítélése céljából***

Irodalmi adatok alapján és a munkánk során tapasztalt, fent részletezett rutinlaboratóriumi, citokin, redox-homeostasis, valamint fémelem analízis eredményeket látva nem találtunk egyetlen olyan biomarkert, módszert vagy pontrendszert,



amely megbízhatóan jelezne a bél-máj tengely, illetve a redox-homeostasis eltéréseit.

Eredményeinket felhasználva új, egyszerű, nem invazív módszert kerestünk és a saját kutatási céljainknak megfelelően módosítottuk.

#### ***4.5.1. Protein-karbonilcsoport meghatározása fluorimetriás módszerrel***

A módosított fluorimetriás módszerrel meghatározott protein-karbonil-koncentráció bizonyos mintáknál jelentősen eltért a DNPH módszerhez képest. A betegek vérplazma mintáit a shear wave elasztográfiával meghatározott májfibrosis mértékével hasonlítottuk össze.

Az NBDH módszerrel mért eredmények alapján szignifikáns különbségek mutatkoztak az F0-F1 és az F4 fibrosis stádiumok között ( $p < 0,05$ ).

Az NBDH-val végzett vizsgálatunk érzékenyebben jelzi a májkárosodás mértékét a hagyományos, DNPH módszerhez képest.

#### ***4.5.2. Új, LiFE (Liver Fibrosis Evaluation) faktor képzése a mért paraméterekkel NAFLD-ben szenvedő betegeknél***

A különböző vizsgálatokban használt paraméterekkel új faktort hoztunk létre. 50, NAFLD-ben szenvedő betegnél (életkor =  $49,4 \pm 13,3$  év, férfi = 28, nő = 22) új faktort képeztünk, a vérplazmában mért szabad szulfhidrilcsoport és a BMI felhasználásával. Az F4 stádiumú betegeknél szignifikánsan alacsonyabb értékeket számoltunk, mint F0-F1-ben ( $p < 0,05$ ). A szignifikáns májfibrosist ( $\geq$ F2 stádium) 61,54%-os szenzitivitással és 37,5%-os specificitással (PPÉ: 0,52, NPÉ: 0,47, AUROC: 0,5384, Odds Ratio:0,96) mutatja ki.

## 5. Következtetések

1. A táplálkozási láncban megjelenő mikotoxinok által okozott redox- és fémhomeosztázis változásait igazoltuk kacsák májszövetében, amely kivédhető az állati takarmányozás természetes antioxidánsokkal történő kiegészítésével.
2. Retrospektív tanulmányban megerősítettük, hogy a bél-máj tengely fontos mediátorai az epesavak. Colitis ulcerosában az epesavak enterohepatikus körforgásában létrejövő zavar, valamint a redox-homeosztázis eltérései jelentős terhet jelentenek a májműködésre.
3. Az általunk vizsgált laboratóriumi paraméterek, biomarkerek, pontrendszerek közül több is (szabad szulfhidril tartalom, leptin, IL-6) hasznos nem invazív eljárásnak bizonyult a krónikus májbetegségek klinikai megítélésére, a patomechanizmus vizsgálatára, és alkalmasak lehetnek a progresszió követésére, terápia monitorizálására.
4. A bélflórát módosító joghurtfogyasztás hatását az adipocitokinek változásai jellemezték a legjobban a vizsgált paraméterek közül. A joghurtfogyasztás kedvezően hatott a betegek redox-homeosztázisának helyreállítására.
5. A biomarkerek felhasználásával új pontszámot (LiFE faktor) alkottunk a májfibrosis jellemzésére NAFLD-ben. A teszt jellemzői alapján az így előállított új pontszám végül azonban mégsem látszott alkalmasnak F2 vagy annál előrehaladottabb májfibrosis kimutatására.
6. A szabadgyökös károsodást jellemző protein-karbonilcsoportok meghatározásához egyszerű vizsgáló

módszert fejlesztettünk tovább, amely jobban jellemzi a májfibrózis mértékét a májbetegség előrehaladtával, mint a DNPH módszer.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

### 10.1. Disszertációhoz kapcsolódó publikációk

1. Egresi A., Kovács Á., Szilvás Á., Blázovics A.: *Bélmáj tengely vizsgálata colitis ulcerosaban – retrospektív tanulmány*, Orvosi Hetilap, 158(26):1014-1021, **Dr. Fehér János Díj**
2. Egresi A., Drexler D., Hagymási K., Blázovics A., Jakab Zs., Kocsis I., Dakó S., Bacsárdi A., Lengyel G.: *Az ökológiai és a konvencionális joghurtfogyasztás lehetséges szerepe a nem alkoholos zsírmájbetegség kezelésében*, Orvosi Hetilap 2020, 161(35): 1466–1474.
3. A. Egresi, K. Süle, K. Szentmihályi, A. Blázovics, E. Fehér, K. Hagymási, H. Fébel: *Impact of milk thistle (Silybum marianum) on the mycotoxin caused redox-homeostasis imbalance of ducks liver*, Toxicon 187 (2020) 181–187.
4. In press: A. Egresi, A. Blázovics, G. Lengyel, Zs. Jakab, K. Süle, D. Kleiner, B. Wichmann, K. Hagymási: *Comparison of various biomarkers and indices for non-invasive assessment of liver fibrosis*, Heliyon

### 10.2. Disszertációtól független publikációk

1. K. Süle, K. Szentmihályi, G. Szabó, D. Kleiner, I. Varga, A. Egresi, Z. May, P. Nyirády, M. Mohai Jr, A. Blázovics: *Metal- and redox homeostasis in prostate cancer with vitamin D3 supplementation*, Biomed Pharmacother. 2018 Sep;105:558-565.
2. Szentmihályi K, Süle K, Egresi A, Blázovics A, May Z: *Metronidazole does not show direct antioxidant activity in in vitro global systems*. Heliyon 2021; 7(4):e6902.