

SZABADGYÖK-KUTATÁS ÉVTIZEDEI

Szabadgyök-kutatás módszerei, néhány fontosabb orvostörténeti vonatkozása

Methods of free radical research, and its primary impact in the history of medicine

Prof.dr. Blázovics Anna, DSc, dr. Kocsis Ibolya

Semmelweis University, Department of Pharmacognosy

Semmelweis University, Institute of Laboratory Medicine, Central Laboratory

blazovics.anna@pharma.semmelweis-univ.hu

Initially submitted March 22, 2018; accepted for publication April 18, 2018

Abstract

Because of spacial limitations, we shall only concern on some of most important topics, but we hope that we can provide an in-depth view into this actually flourishing area of research. Free radical research experienced some ups-and-downs in the past decades, however it reached always higher levels. Nowadays even molecular biologists cannot neglect free radical research. Although the medicine was substantially benefited from these researches, we may experience some hiatus on the clinical level because of the missing breakthrough by examination of redox status of the patients. The immediate cause for this is that many different parameters are needed to be exactly observed at the same time, which needs a large amount of financial support. The second-hand cause is that the discussion of free radical research results and its usefulness is only a part of the facultative courses.

Kulcsszavak: szabad gyökök, módszerek, orvostörténet

Keywords: free radicals, methods, medical history

Szabadgyökös kutatások kezdetei

A szabadgyök-kutatás évtizedei alatt jelentősen változott a kutatás módszertana, műszerigénye. Amíg kezdetben fizikusok foglalkoztak a szabad gyökök keletkezésével, a gyökképződés kinetikájával, a folyamatok mechanizmusának megismerésével, a szabadgyökös reakciók lecsengésének vizsgálatával, direkt módszerek voltak alkalmasak a változások tanulmányozására. A szabadgyök kutatásban Zavoisky az 1940-es évek elején végzett elektronspin-rezonancia (ESR) kutatásai meghatározó jelentőségűek voltak. Az ESR technikát ma már a kémia, fizika, biológia és az orvostudomány számos területén alkalmazzák [1].

A világháborús események felgyorsították a radioaktivitás káros hatásainak kivédésével kapcsolatos kutatásokat is, tekintettel arra, hogy az amerikaiak atombomba kifejlesztésén dolgoztak, és a németek is jelentős kutatásokat végeztek.

Az atomtámadások következtében az indirekt sugárkárosodás a víz radiolízise és a szervezet makromolekulái közötti reakciók eredménye. A víz radiolízise során hidroxil-gyökök (OH[•]) és hidratált elektronok (H₂O^{•-}) jönnek létre. Reakcióidejük 10⁻¹¹ sec. Másodlagos szabad gyökök molekuláris oxigén jelenlétében képződnek, ilyenek a szuperoxid gyök (O₂^{•-}), a perhidroxil gyök (HO₂[•]) és nem gyök, de radikális hatású hidrogén-peroxid (H₂O₂). Reakcióidejük 10⁻⁸-10⁻³ sec [2]. A sugárkárosodások kivédése

kapcsán élelmiszerek tesztelése közben találtak rá a Brassicaceae család növényeire, a káposztafélékre, de évtizedekig nem tudták, hogy a glükozinolátokból származó izotiocianátok azok a hatóanyagok, amelyek a radikális gyökökkel szemben a szignáltranszdukció során védelmet biztosítanak [3,4].

A hadiipar másik fontos iránya a gumiabroncsok élettartamának fokozása érdekében a szintetikus antioxidáns vegyületek kutatása volt [2].

Korai kutatások módszerei

Később, amikor kiderült, hogy a szabad gyökök az élő szervezetben is keletkeznek, akkor a direkt módszerek adaptálására került sor, és a dolog természetéből eredendően megjelentek az indirekt módszerek, melyek nagyon gyorsan előtérbe kerültek. Ezek az úgynevezett „fingerprint” technikák az oxidatív károsodások eredményeképpen keletkező molekulák detektálását célozták meg.

Korai kutatásainkban az antioxidánsok hatásmechanizmusának felderítésében az általunk is alkalmazott direkt módszerek, az ESR spektroszkópia és az impulzus radiolízis voltak [5-7].

A szabadgyök-kutatás in vitro fiziko-kémiai módszerei, mint már említettük, egzaktak és reprodukálhatók. Direkt módszerek esetében in vivo már bonyolultabb a meghatározás. Például az ESR-technikák fagyasztott, porított mintákat igényelnek. A legnagyobb probléma a műtermék megjelenése. A jó spincsapda kritériuma a vízzoldhatóság, a stabilitás vizes közegben, a biológiai inertség, a gyors bejutás a megfelelő kompartmentbe, a gyors szabadgyök-trapping, a stabil vegyületképzés a gyökkel, a jó kivonhatóság és a jó kimutathatóság. A gyökcsapda nem károsíthatja a biológiai rendszert. Ismert spincsapdák például az 5,5'-dimetil-1-pirrolin oxid (DMPO), 3,3,5,5-tetrametil-1-pirrolin-N-oxid (M₄PO), (4-piridil-1-oxid)-N-tercier-butilnitron (POBN) vagy az alfa-fenil-tert-butil-nitron (PBN). A PBN alkalmazásakor azonban a termék és a szövet interakcióját figyelték meg [8].

Az impulzus radiolízis technika alkalmazásakor a rövid idejű, nagy intenzitású elektronsugár-impulzus hatására a besugárzott mintában létrejövő gyökök és ionok a kísérleti körülmények célszerű megválasztásával szelektíven oxidáló vagy redukáló tranziensekké alakíthatók. A vizsgálati anyaggal lejátszódó reakciók abszorpciós spektrumuk segítségével optikai úton követhetők és a reakciók sebessége ennek alapján közvetlenül megállapítható [5].

A legkorábbi és sok laboratórium számára elérhető indirekt módszerek a lipidek oxidatív károsodásának vizsgálatát célozták meg, tekintettel arra, hogy az ipar már korábban igényt tartott arra, hogy megfelelő módszerek álljanak rendelkezésre a gyorsan romló élelmiszerek minőségellenőrzésére, tárolásukkal kapcsolatos technológiai lépések optimalizálására.

A lipidperoxidációs láncreakció iniciálása, propagációja és terminációja viszonylag egyszerű spektrofotometriás módszerek kifejlesztését tette szükségessé. A legkorábbi és viszonylag informatív eredményeket adó módszerek az iniciálásnál keletkező diénkonjugátumok, a láncreakció során képződő lipidhidroperoxidok, a lipidperoxidációs közti- és végtermékek, a 4-hidroxi-nonenál, illetve a malondialdehid koncentrációinak meghatározásai voltak. A fotometriás (kolorimetriás) eljárásokat egyszerűségük és megfelelő érzékenységük tette széles körben elterjedté. A magasnyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) metodikák bevezetésével növelni lehetett a specifitást.

A HPLC analízisek detektálására spektrofotometriás, valamint fluoreszcens eljárás is alkalmazható. E technika segítségével a tiobarbitursavval reakciót adó vegyületek szeparálása megvalósítható. A HPLC vizsgálatok azonban költséges, műszerigényes módszerek.

A szövetekben zajló lipidperoxidációs folyamatokat a kilélegzett levegő etán és pentán tartalmának meghatározásával is követni lehet. Ezek a szénhidrogének a többszörösen telítetlen zsírsavak (omega-3-, omega-6 PUFA) peroxidációja során keletkeznek.

Ezek az olcsó és egyszerű módszerek - hibáik ellenére is - különböző antioxidáns tulajdonságú vegyületek védő hatásának igazolására kiválóan alkalmasak [9].

Az élő szervezetben zajló szabadgyökös folyamatok megismerése és új módszerek fejlesztése

A kutatások évtizedei alatt kiderült, hogy az emlősök, főleg az emberek szempontjából fontos, főbb szabadgyököket termelő folyamatok a sejtek energiaellátását biztosító mitokondriális oxidatív metabolizmus, a mikroszómális méregtelenítő kevertfunkciójú monooxigenáz enzimrendszer, a prosztaglandin bioszintézis, a konstitutív és indukálható NO-szintetáz aktivitás, a fagociták, monociták, makrofágok, Kupffer-sejtek „respiratory burst”-je, illetve a különböző szövetekben, szervekben lokalizált transzmembrán enzimkomplexek, a NOX1-5 és a DUOX 1-2 (NADPH-oxidáz izoformák) funkciója során képződő szuperoxid gyök, a peroxiszómákban képződő H₂O₂ autooxidációja [10-12].

Suh és munkacsoportja először 1999-ben számolt be egy szuperoxid-geneáló oxidázzról, egy transzmembrán enzimkomplexről a Nature-ben, mely a colon epithelsejtjeiben található gp91^{phox} homológ. Működése során a NADPH-ról szállít elektront az oxigénre. A NOX izoformok expressziója megnő különböző tumorokban. Az enzimkomplex valószínűsíthetően a bélben található mikroorganizmusok elleni védelmet biztosítja. Szerepe lehet gyulladásos bélbetegségekben is, ezért intenzív kutatásokat folytatnak még ma is ezen a területen [13].

A szervezetben keletkező szabadgyökök létrejöhetnek hipoxiában, hiperoxiában és normális oxigéntenzió mellett is. A szabadgyök-koncentráció befolyásolható az anyagcsere oxidációs folyamatainak szabályozásán keresztül. A lipidperoxidáció szabályozott körülmények között a foszfolipid turnover része [14,15].

Az is megerősítést nyert, hogy az élőlények szigorúan egymásra épülő védekező mechanizmusai lehetővé teszik, hogy a szabadgyökös reakciók bizonyos határokig a membránszerkezetek és enzimfunkciók károsodása nélkül végbemehessenek, így a szabadgyökök fiziológiás szerepe biztosított.

Az egészséges szervezet egy oxidáló atmoszférában kell, hogy biztosítsa az alacsony szöveti oxigén tenziót, ami kb. 26 Hgmm. Meg kell akadályoznia a szabadgyök-túlprodukción, amit egymásra épülő védelmi mechanizmussal, a védekezés három szintjén valósít meg.

Az elsődleges antioxidáns vonalhoz tartoznak az enzimatisz védekezés képviselői, a szuperoxid-dizmutázok (SOD-ok), kataláz, peroxidázok, glutation-S-transzferáz, DT-diaforáz, reduktázok. Az enzimatisz védekezést kiegészítik: az antioxidáns, scavenger molekulák, az antioxidáns tulajdonságú vitaminok, kofaktorok, tiol-, foszfor-, amin-, poliamintartalmú vegyületek, fenolok, kinolinok, flavonoidok, poliénok, glükóz, urát, bilirubin stb.

Az extracelluláris tér védelmét az albumin, cöruoplazmin, transzferrin és a tetramer SOD biztosítja.

A harmadik védelmi vonal képviselői a DNS-, fehérje- és lipiddegradátumokat elimináló repair mechanizmusok. A károsodott DNS molekulákat exonukleázok, endonukleázok, glikozilázok, polimerázok és ligázok javítják. A fehérje degradátumok eltakarításában proteinázok, proteázok, peptidázok, és makroxiproteinázok vesznek részt. Az oxidált lipidek eliminálásában például a foszfolipázok, az organikus hidroperoxidokat bontó glutation-peroxidáz, transzferázok, aldehid-reduktázok, epoxi-hidrolázok, UDP-glükuronil-transzferáz, citokróm P450 izoenziemek vehetnek részt [10,16].

A kutatások újabb és újabb módszerek kifejlesztését tették szükségessé. Az indirekt módszerek esetében mára már széles választék áll rendelkezésre. Vizsgálható többek között az autooxidáció, a fotooxidáció, az oxidoreduktázok aktivitása, koncentrációja, az elektrontranszport, a xenobiotikumok és vegyületek, gyógyszerek kölcsönhatása vagy éppen a dekompartmentalizáció, a sejtek nekrozisa, apoptozisa, az autofágia jelensége stb. A műszerezettség ennek megfelelően szintén változatos. A leggyakrabban használatos műszerek továbbra is a koloriméterek, spektrofotométerek. Elég eltérjedtek az oxigráfok,

nefelométerek, aggregométerek, lumino- és fluoriméterek. Különböző analitikai technikák, HPLC, LC, izotóp technikák, immunológiai vizsgálati módszerek stb. [9,17].

Az enzimaktivitás mérések közül leggyakrabban a glutation-redox rendszer tanulmányozására és a szupeoxid-dizmutázok meghatározására került sor. A glutation-peroxidáz aktivitásának mérésénél vagy a keletkező redukált glutation (GSH) koncentrációját határozzák meg, vagy a reakcióban felhasználódó NADH fogyását detektálják.

Az oxidatív károsodás egyéb biomarkerei, a nem-enzimatis eredetű eikozanoidok családját alkotó izoprosztán vegyületek, a szöveti foszfolipidek oxidációja során keletkeznek, reaktív oxigén intermedierek hatására, majd foszfolipázok közreműködésével kerülnek a keringésbe. A nem megfelelően tárolt szöveti mintákban azonban, mint melléktermékek is megjelenhetnek. E vegyületek vizsgálatára immunoassay módszer is rendelkezésre áll, azonban igazán megbízható eredményeket csak tömegspektrometriával kombinált gáz-kromatográfiás eljárásokkal lehet elérni.

Az izoprosztánok közül a 8-epi-posztaglandin $F_{2\alpha}$ rendelkezik biológiai aktivitással, mint lehetséges pulmonáris és renális vasoconstrictor. A vegyület a gyengült antioxidáns kapacitás, és az oxidatív stressz markereként említhető. Jelenléte számos betegségben kimutatható.

A 8-OH-2'-deoxiguanozin a DNS oxidatív károsodásának egyik bomlásterméke, amely egészségesekben is detektálható. Ha viszont a vizeletben az ürített 8-OH-2'-deoxiguanozin koncentrációja emelkedett, az a szövetekben zajló promutagén oxidatív folyamatok fokozott mértékét jelzi. Immunoassay és elektrokémiai detektálással kiegészített HPLC technika áll rendelkezésre.

A fehérjék oxidációja, a protein-karbonil csoportok kimutatása a károsodott lipid – és DNS vegyületek mellett szintén jelentős előrelépés volt. E vegyületek jelenléte a szöveti mintákban fontos diagnosztikai információkat hordoznak. Az aminosav oldalláncok (prolin, arginin, lizin) direkt oxidációja eredményeként keletkező vegyületek kémiaiilag stabilak, ami előnyös tulajdonság a vizsgálati minták tárolása és detektálása szempontjából. A meghatározásukra alkalmas fotometriás eljárások viszonylag egyszerűek a 2,4-dinitrofenilhidrazinnal történő redukció révén. A keletkező reakciótermék az UV-tartományú fényt jól abszorbeálja, így könnyen fotometrálnak. Az eljárás érzékenyebbé tehető HPLC-vel történő kiegészítéssel, amely lehetővé teszi a protein-karbonilok egyenkénti detektálását különböző fehérjék elegyét tartalmazó vizsgálati mintában is.

Jelentős előrelépést jelentett az immunológia módszerek kifejlesztése, mint például a mieloperoxidáz (MPO-EIA), a glutationperoxidáz (GPx-EIA) humán laktoferrin (Lacto-EIA), 8-isoprostae (8-epi-PG-F2-alpha), 8-OHdG EIA (össz-8-izoprosztán), nitrogén-oxid-szintáz. Ezen kívül enzimkötéses immunoassay, egy- vagy kétdimenziós gélelektroforézis (SDS), és Western-blot immunoassay metodikákat is alkalmaznak [9,17].

A szabadgyökös reakciók kutatásában a fehérje és polipeptid-meghatározásoknak különösen nagy jelentősége van. Vizsgálhatók az akutfázis fehérjék, citokinek, növekedési faktorok, hormonok, tumormarkerek stb. A vizsgáló módszerek közé tartoznak az enzimkötéses immunoesszé (ELISA), fluoreszcens polarizációs immunoesszé (FPIA), mikropartikuláris immunoesszé (MEIA), elválasztásos technikák (elektroforézis), tömegspektrometriás mérések. A „Biochip” és „Bioplex” multiplex rendszerek egyszerre több paramétert képesek meghatározni. Az „Evidence Biochip Array Analyzer” klinikai sorozatvizsgálatok elvégzésére kifejlesztett műszer. A gélelektroforézises technikák, Western blot analízis, a tömegspektrometria alapú proteomika, az ionkromatográfia, a cirkuláris dikroizmus spektroszkópia vizsgáló módszerek egyre elterjedtebbek.

A hisztopatológiai vizsgálatok is nagy fejlődésen mentek keresztül. Az elektronmikroszkópos tanulmányok mellett a fluoreszcens mikroszkópia, a konfokális pásztázó mikroszkóp (laser scanning microscope) is tért hódított az orvosi/biológiai kutatásokban. Az immunhisztokémia vagy az immuncitokémia (IHC) technika alkalmas arra, hogy meghatározzuk egy-egy adott fehérje sejten belüli elhelyezkedését.

Megfelelő fluoreszcens festéssel meghatározhatjuk az apoptózist vagy nekrozist elszennvedett sejtek mennyiségét sejttenyészetekben, vagy különböző szövetekben. Például az annexin V fehérje reagálva a membrán külső rétegébe áthelyeződött foszfatidilszerinrel zölden fluoreszkál és jelzi sejt apoptotikus pusztulását. A propidium jodid a szétesett sejt DNS fragmentumokhoz kötődve vörös színben fluoreszkál, és jelzi a sejt nekrotikus halálát [18,19].

A redox-egyensúly fenntartásában nélkülözhetetlenek a d-mező elemek, elsődlegesen a Fe, Cu, Zn, Mn, és a nemfémes és fémes jelleget egyaránt hordozó Se. Tekintettel arra, hogy mind az oxidációs folyamatok, mind az antioxidáns védelem aktivitása fémelem-függő, ezért nem hagyható el a szöveti mikroelemtartalom meghatározása, mely megbízhatóan például az induktív gerjesztésű plazma optikai-emissziós spektrometria (Inductively coupled plasma optical emission spectrometry, ICP-OES) vagy (inductively coupled plasma atomic/optical emission spectrometry, ICP-AES) segítségével tanulmányozható. A fémek jelentőségét a redox-homeosztázisban hazánkban jelenleg is intenzíven kutatják. A fémion-homeosztázis megváltozásának jelentőségét igazolták alkoholos májbetegségben, porphyria cutanea tardában, Wilson-kórban, vastagbélrákban és ciszplatin-kezelés kapcsán. Számos említésre méltó közlemény született e területen [20-24].

Ezek az analízisek újabb lehetőséget nyújtanak az egyes betegségek kialakulási mechanizmusának mélyebb megértésére.

Az antioxidánsok kutatása és a felmerülő problémák

Kezdetben úgy vélték, hogy a szabad gyökök csak károsak lehetnek az élő szervezet számára, és ezért az antioxidánsok felkutatása és a szintetikus vegyületek tesztelése került a kutatások előterébe. Az antioxidánsokat többféleképpen lehet csoportosítani. Lehetnek természetes eredetűek és mesterségesek. Molekulaszerkezetük is rendkívül változatos lehet. Néhány fontos típusuk: fenol, kinolin, flavonoid, tiol, foszfor, amin, polien stb. Hatásmechanizmusuk szerint lehetnek univerzálisak és speciálisak, pl. peroxid-gyökfogók, allilgyökfogók, H₂O₂ bontók, fémkomplex-képzők, radikális gyök-scavengerek stb. Lehetnek primer és a primer antioxidánsok hatását felerősítő szekunder antioxidánsok, mint például a citromsav, borkósav, foszforsav.

A kutatók egyes gyökök befogására különböző antioxidáns molekulaszervezetek szintézisét tartották fontosnak. Számos vegyülettel próbálkoztak. Például sok szeléntartalmú vegyületet próbáltak ki, ilyen volt az ebszelen, az ebszelen analógok, dapszon diaril – szelenidek, sőt a kéntartalmú analógok is, vagy a butil-hidroxi-toluol (BHT), 2,2,4-trimetil-1,2-dihidrokinolin (TMQ) stb. Hamarosan kiderült azonban, hogy az antioxidánsokról alkotott kép nem tökéletes [8].

A vitaminok közül az A-vitamin, C-vitamin és E-vitamin antioxidáns hatását tanulmányozták a legtöbben, azonban rá kellett jönni, hogy e vitaminok antioxidáns hatásuktól függetlenül számos élettani funkciót látnak el, ami nem függ a primer gyökfogó hatástól, bár nem zárható ki, hogy az antioxidáns hatást hordozó molekulaszervezet szükséges e funkciók ellátásához [25].

Slater professzor, aki Szent-Györgyi Albert barátja és riválisa volt, az 1980-as években a (+)-cyanidanol-3 katechol típusú vegyület élettani hatásával foglalkozott, és alkoholos májbetegség gyógyítására Catergen néven gyógyszerre fejlesztett. A Catergen hazánkban is forgalomba került, de 18 olasz májbeteg sajnálatos halála miatt a készítményt bevonták.

A szintetikus vegyületek sem váltották be maradéktalanul a hozzájuk fűzött reményeket, mert kiderült, hogy ha egy antioxidáns nagyon erős hatású, az az élő szervezet számára nehezen tolerálható, vagy toxikus. Nem lett gyógyszer a magyar kutatók által kifejlesztett MTDQ-DS dihidrokuinolin típusú vegyület sem, bár a Semmelweis Egyetemen és a Pécsi Tudományegyetemen folyó kísérletek biztatóak voltak [8].

Halliwell Lancetben megjelent „The antioxidant paradox” című összefoglalójában ezt a kérdéskört feszegette [26].

Állatkísérletek kapcsán arra is fény derült, hogy a szervezetbe bevitt antioxidáns vegyületekben gazdag táplálékok, étrend-kiegészítők hatóanyagainak felszívódása jelentősen eltér. Például a polifenolos vegyületek, flavonoidok, antociánok csak nagyon kis koncentrációban (1-2%) érik el a keringést eredeti molekulaformájukban, míg a tápcsatornában inkább antioxidáns aktivitásuk érvényesül a távoli szervekben a szignál transzdukciót képesek befolyásolni. A többkomponensű készítmények esetében nehezen állapítható meg, vajon melyik vegyület károsíthatja a szöveteket. Túlzott mértékű fogyasztásuk alkalmával például „purple colon vagy zebra colon” alakulhat ki [25].

Mielőtt visszatérnénk a módszerek fejlesztéséhez, nem kerülhetik el a figyelmet a múlt század nagy kutató egyéniségeinek meghatározó felfedezései.

A szabadgyök-kutatás mérföldköveit lerakó Nobel-díjas kutatók

Büszkeséggel tölthet el bennünket, hogy a Nobel-díjas Szent-Györgyi Albert (1941) nevéhez fűződik az a tudományos felismerés, hogy a fehérjék élő állapotban csak *in vivo*, az élő sejtben lehetnek, és a kristályosítás során elvesztik "élő" jellegüket. Az élő állapot olyan sajátos fizikai állapot, amely elektronspin-rezonancia (ESR) jelet ad, vagyis paramágneses. Bár gondolatait és korai tanulmányait csak évtizedekkel később, 1977-ben sikerült bizonyítani, tény, hogy zsenialitása már korán nagy hatással volt a világ orvosbiokémiával foglalkozó tudósaira. Szent-Györgyi szerint a metil-glioxál és a glutation-SH antagonizmusa az élet hajtóereje. A sejtsztódás nem képzelhető el az SH-csoport reakciói, és annak redoxipotenciálja nélkül. A metil-glioxál szerepét az élő szervezetben Szent-Györgyi azzal magyarázta, hogy a metil-glioxál a fehérjéktől elektronokat von el, így ezeket a molekulákat félvezetőkké alakítja, „gyökösíti”, élőkké alakítja. A metilglioxál a fehérje akceptor szennyeződése, mely az -NH₂ és -SH csoportokhoz képes kötődni. A metilglioxál fékezi a sejtsztódást [27,28].

Magyarországon az 1970-es évek elején mind Szent-Györgyi, mind Hevesi Nobel-díja arra inspirálta a kutatókat, hogy kapcsolódjanak be az akkora már divatosá váló szabadgyökös kutatásokba. Így nem meglepő az sem, hogy hazánkban éppen Szegeden kezdődtek meg az orvosi vonatkozású szabadgyökös kutatások a József Attila Tudományegyetemen, melynek vezéregyénisége Matkovics Béla professzor volt [2].

Az élő szervezetben lejátszódó szabadgyökös reakciók intenzív kutatása McCord és Fridovich (1969-1976) munkásságához, a szuperoxid-dizmutáz (SOD) felfedezéséhez, szerkezetének és funkciójának tisztázásához fűződik [29]. Samuelsson, Corey, Vane és Moncada nevéhez kapcsolódik a peroxid-származékok bioszintézisének igazolása az arachidonsav-kaszkádban. Samuelsson, Corey, Vane munkásságát 1982-ben Nobel-díjjal jutalmazták. Az Upjohn Co. „Special Report”-ja 1982-ben jelent meg Nelson, Kelly és Johnson tollából. [2,30]. A nitrogén-monoxid (NO) molekula az 1992-es évben már az "év molekula" lett. Élettani jelentőségének felismerése a szintén Nobel-díjas Ignaro, Nathan, és a még mindig nem kellően elismert Moncada és munkatársai nevéhez fűződik. McCord 2000-ben egy remek összefoglalót írt a *The American Journal of Medicine* hasábjain „The evolution of free radicals and oxidative stress” címmel [31].

A szabadgyökös kutatásokat elősegítő új felfedezések Nobel-díjasai

Jelenlegi ismereteink szerint a sejt citoplazma alkotóinak lebontása két fő úton mehet végbe, egyrészt a lizoszóma-közvetített autofág degradáción, másrészt az ubiquitin-proteaszóma rendszeren keresztül. E felfedezések nagyban hozzájárultak a sejtek működésének pontosabb megértéséhez.

Porter és posztdoktor munkatársa Ashford figyelte fel először az „autofágia” jelenségére a Rockefeller Intitutban 1962-ben, de ők nem jól értelmezték a jelenséget. De Duve írta le először az intracelluláris emésztést (autolízis). De Duve 1974-ben fiziológia és orvostudományi Nobel-díjat kapott. Az autofágia valódi megismeréséhez a német származású Hruban és munkatársai korábbi megfigyelései is hozzájárultak [32-34].

Az autofágia a környezeti tényezők változásával, pl. sugárzás, hőmérsékletváltozás, kemikáliák, alkaloidok, detergensok, aminok stb. váltható ki. A jelenséget „induced autophagy”-nak nevezik. A károsító hatásokra (stresszorokra) válaszol. Az éhezés (elsősorban az aminosav megvonás) ugyancsak erős autofág reakciót indukál. Ilyenkor a sejt a saját anyagait, makromolekuláit bontja le, emészt meg, ezzel anyagokat és energiát szolgáltatva a mindenképp szükséges szintetikus folyamatok fenntartásához. Az autofágia esszenciális a sejt túlélésében és a sejt megújításában. A hibás szerkezetű fehérjék eltávolítása szintén autofágiával megy végbe. Az autofág folyamat abnormális működése számos patológiás folyamat kialakulásához vezethet, pl. különböző ráktípusok, neurodegeneratív betegségek, Alzheimer-, Parkinson-, Huntington-kór, II. típusú cukorbetegség, izomsorvadás, agyvérzés, infarktus, paraziták vírusok, baktériumok által okozott fertőzések, sőt a progéria is ennek tulajdonítható.

Bár Hershko, Ciechanover és Rose Nobel-díjas kutatók sem szabadgyökös kutatásokkal foglalkoztak, mégis hallatlan segítséget jelentettek az ubiquitin-proteaszóma rendszer felfedezésével és funkciójának meghatározásával ezen a területen.

A károsodott molekulák, ezek lehetnek szabadgyökös károsodások is, az ubiquitin-proteaszóma rendszerben bomlanak le. A lebontásra kijelölt fehérje először megjelölődik, a fehérje poli-ubiquitinálódik. A komplex az ubiquitin csoportokon keresztül a proteaszóma felszínén található ubiquitin receptorhoz kapcsolódik. Deubiquitináló enzimek eltávolítják az ubiquitin csoportokat, és a lebontásra ítélt és proteaszómához dokkolt fehérje letekeredik. A fehérje a csőszerű proteaszómán áthaladva feldarabolódik peptidekre. A polipeptid lánc hasítása a proteaszóma katalitikus alegységében történik, amelyet számos enzimhatású fehérje épít fel [35].

Ezek a kutatások speciális biokémiai, molekuláris biológia és fehérjeanalitikai módszereket igényelnek.

Újabb lehetőségek a szabadgyök-kutatásban

A szabadgyökös reakciók szerepét a különböző betegségek pathomechanizmusában kezdetben viszonylag bonyolultnak tűnő kémcsőreakciókkal igazolták, de nőtt az igény gyorsabb, rutin számára is alkalmas módszerek iránt.

Megjegyzendő, hogy itt sem törekszünk teljességre. Sajnálatos, hogy az Oxys, Randox, Calbiochem, Bioxytech, Cayman Chemical, Merck, Sigma-Aldrich cégek kitjei még mindig csak a kutatók számára jelentenek megbízható módszereket, melyek magas árfekvésük, és specialitásuk miatt egy-egy kit alkalmazása esetén sajnos nem adnak megfelelő információt a betegségek gyógyítása/gyógyulása kapcsán. Az alább felsorolt néhány, főleg kolorimetriás és kisebb részben lumineszcenciás meghatározáson alapuló kitéket kisebb-nagyobb módszerbeli különbséggel az említett cégek midegyike forgalmazza: például Glutathione Assay kit, Glutathione Peroxidase Assay Kit, Glutathione Reductase Assay Kit, GSH/GSSG Ratio Assay Kit, Superoxide Dismutase Assay Kit, a lipidperoxidok meghatározására kifejlesztett kit az LPO-586TM Assay a Bioxytech-től stb.

Kifejlesztettek prosztoglandinokat, interleukineket meghatározó kiteket, az apoptóztist tanulmányozó kiteket, mint például a kaszpázok aktivitását meghatározó kitek, hősokk proteinek vizsgálatára stb. Ezek beszerezhetőek többek között a Cayman, az Abnova és Sigma-Aldrich cégektől.

Mivel az antioxidáns védelmi vonalak, illetve az antioxidáns vegyületek között szinergizmus lehetséges, valamint felismerték, hogy a szabad gyökök szignálként hatnak az antioxidáns enzimek szintézisére, egy-egy kiragadott paraméter koncentrációjának, vagy egy adott enzim aktivitásának önmagában történő meghatározása nem tükrözheti megfelelően a szervezet redox-egyensúlyának valódi állapotát. Ezért a szervezet oxidatív biokémiai folyamataiban szerepet játszó jól ismert enzimek, a szuperoxid-dizmutázok, glutation-peroxidáz, glutation reduktáz, a kataláz, az indukálható NO-szintetáz stb., oxidációs, peroxidációs termékek vizsgálatán túl, anyagi megfontolások miatt is szükséges lett a „globális” paraméterek meghatározása. Ilyen módszer többek között a total antioxidant státuszt (TAS) mérő is az ABTS* szabad gyök alkalmazásával. - Az ABTS (2,2'-azino-bisz (3-etilbenzil-tiazolin-6-szulfonsav), szabadgyökös formája az ABTS* gyök kation. A mintában lévő antioxidánsok semlegesítik a gyököt, csökkentik a mérő rendszer színreakcióját. Ha a reakció során a troloxot használják standardnak, akkor Trolox-egyenértékű antioxidáns kapacitást (TEAC) adnak meg a szöveti antioxidáns képesség mérőszámaként. A plazma redukálóképességének (FRAP) meghatározására a vas-tripiridil-triazin (Fe^{3+} -TPTZ) komplex redukcióját vizsgálják. Az abszorbancia változása összefüggést mutat a szöveti antioxidáns kapacitásával. Ezek spektrofotometriás módszerek [9,17].

A fluoreszcencia és kemilumineszcencia jelenségének vizsgálatán alapuló globális módszerek is alkalmasak szélesebb körű vizsgálatok elvégzésére. A "total radical trapping antioxidant parameter" (TRAP) meghatározása, amely a vizsgálati minta szabadgyök-közömbösítő, antioxidáns kapacitását jellemzi, fluoreszcencián alapuló metodika. A Semmelweis Egyetemen kifejlesztett kemiluminometriás „össz-scvaenger kapacitás” mérése is kiválóan alkalmas szabadgyökös károsodások tanulmányozására betegségek kapcsán, vagy antioxidánsokban gazdag étrend hatásának vizsgálatára [17, 36].

A szabadgyökös reakciókat vizsgáló módszerek zavaró tényezői

Végül, de nem utolsó sorban foglalkoznunk kell egy speciális területtel, az étrend-kiegészítők és gyógyteák fogyasztásának kérdéskörével.

Az antioxidánsokban és vitaminokban gazdag étrend-kiegészítők, ahogyan már korábban említésre került, számos egyéb hatóanyagot is tartalmaznak, amik nem várt hatásokat fejthetnek ki. Feltétlenül meg kell említeni Dasgupta és Bernard 2006-ban publikált összefoglaló közleményét, amiben felhívták a figyelmet arra a tényre, hogy egyes természetes eredetű hatóanyagok jelentősen torzíthatják a laboratóriumi diagnosztikai mérések eredményeit. Felhívják a figyelmet az analitikai mérőmódszerekre kifejtett direkt zavaró hatásra. Elsősorban az immunkémiai meghatározások során, például a fluoreszcens polarizációs immunoesszé területén tapasztaltak tévesen pozitív digoxin vérszinteket. A májműködés vizsgálatoknál a transzaminázok aktivitásértékei emelkedhetnek a hatóanyagok lehetséges enzimindukciót kiváltó vagy épp toxikus hatása miatt. Főleg az onkológiai betegellátásban nagy koncentrációban alkalmazott aszkorbinsav kémiai tulajdonságából adódóan, az oxidációs reakcióban kialakuló színes reakciótermék spektrofotometriás detektálásán alapuló mérőmódszerek alkalmazásakor, elsősorban a vérszérum anyagcsere-metabolitjainak, a glükóz, húgysav, koleszterin, stb. vizsgálatoknál torzíthatja az eredményeket.

Egyes teakészítmények fogyasztásakor direkt hatást figyeltek meg analitikai mérőmódszerekkel. Az alkalmazott immunkémiai eljárásokban, melynek során poliklonális vagy monoklonális antitestek segítségével kialakuló komplex vegyületek érzékeny analitikai eljárással történő detektálása alapján kerül kiszámításra az adott gyógyszer hatóanyag, -például a digoxin gyógyszer szint koncentrációja a vérben - az

interakció esélye a monoclonális antitesteket alkalmazó mérőmódszereknél nagymértékben csökkenhet a teák egyes bioaktív vegyületeinek hatására.

Szintén a digoxin terápiás gyógyszer szint meghatározását zavarhatják olyan fájdalomcsillapításra, gyulladáscsökkentésre alkalmazott teakészítmények, amelyek a digoxin szerkezetével nagymértékű hasonlóságot mutató bufadienolid típusú vegyületeket is tartalmaznak (bufalin, cinobufagin, resibufogenin). E vegyületek kardiotonikus hatással rendelkeznek, melyek a tea nagyobb dózisban való fogyasztása esetén fatális kimenetelű mellékhatásokat okoz(hat)nak. A zavaró hatás a különféle mérőmódszerek, analitikai eljárások vonatkozásában különböző mértékű és természetű lehet, olykor pozitív, de egyes esetekben negatív jellegű interferencia figyelhető meg. A legkisebb mértékű zavaró hatást a chemilumineszcens immunkémiai meghatározások esetében írták le. Különösen nagy a veszély, ha a fogyasztott étrend-kiegészítő, vagy tea hamisítvány. Az étrend-kiegészítők hamisítása kapcsán olyan hatóanyag vérszintjét mérték egy véletlen pozitív eredmény alkalmával (phenitoin), mely hatóanyag, az adott készítményben, szennyezőként volt jelen.

A hipericint tartalmazó készítmények, melyek a citokróm P450 enzimkomplex indukcióján keresztül fokozhatják a máj gyógyszermetabolizáló hatását, eredményezhetnek a korábban mért gyógyszer szintekhez képest alacsonyabb koncentrációkat a laboratóriumi monitorozások során. Az enzimindukciós hatás többféle gyógyszer esetében, például cyclosporint tartalmazó immunszuppresszánsok, HIV vírus proteáz inhibitorok, vagy más daganatellenes hatóanyagokkal (irinotecan, imatinib mesylát) kapcsolatban is alacsonyabb értékeket adnak.

A kumarintartalmú gyógynövénykivonatok nagymértékben befolyásolhatják a véralvadást, erősítve az antikoaguláns vegyületek (warfarin) hatását, amit a kelleténél megnyúltabb INR értékek (International Normalised Ratio) jeleznek. A nagy K-vitamintartalmú gyógynövény-készítmények viszont hatástalanná is tehetik az antikoaguláns gyógyszerek hatását, mint például a *Curcuma longá*t tartalmazó készítmények. Klinikai laboratóriumi vizsgálatok segítségével ellenőrizhető a májtoxicitás. A transzaminázok (ASAT, ALAT), valamint a gamma-glutamil-transzferáz esetében 60-70-szeres enzimaktivitás emelkedést is detektáltak már. Átmeneti májgyulladásal járó eseteket írtak le például fagyöngy tartalmú készítmények kontrollálatlan fogyasztásával kapcsolatban is. Algtartalmú diétás készítmények - magas jódszintje miatt - fogyasztása következtében tapasztaltak hyperthyreosist. A glycyrrhizinsav gátolja a 11- β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz enzim működését, aminek következtében a beteg alacsony szérumkálium koncentrációval járó pseudo-hyperaldosteronismus állapotába kerül.

A fokhagyma- és ginseng-tartalmú készítmények fogyasztása kerülendő legalább 7 nappal a műtétek előtt, ugyanis thrombocita aggregációt gátló hatáuk súlyos vérzéseket okozhat [37- 39].

A gyógyteákkal kapcsolatban megfigyelték, hogy azok fémiontartalma már 2 dl elfogyasztása kapcsán is a napi ajánlott bevitel jelentős %-át tartalmazhatja. Különösen veszélyes, ha a tea nemcsak a szervezet számára szükséges nyomelemeket, hanem idegen eredetű (szennyeződésből származó) toxikus fémeket is tartalmaz [11,40].

Összefoglaló gondolatok

A szerzők ebben az áttekintésben a szabadgyök-kutatás módszereit és műszereit kívánták röviden bemutatni az évtizedek alatt történő, gyakran ugrásszerű fejlődések tükrében. A szabadgyökös kutatások ma már olyan szerteágazóak, olyan sok kutatási terület ismerte fel jelentőségüket, hogy nem hagyhatók figyelmen kívül sem a gyógyszerkutatásban, sem a betegellátásban. A klinikum számára a redox-homeosztázis megismerése különösen fontos, mert a betegségek kapcsán kibillenő egyensúly súlyos, akár életveszélyes következményekkel is járhat, ezért kívántuk felkelteni az érdeklődést a kínálkozó lehetőségekre.

BIBLIOGRÁFIA

- [1] ZAVOISKY, E. K.: Paramagnetic relaxation of liquid solutions for perpendicular fields. *Zhur Eksperiment i Theoret Fiz*, no. 15. 344–350, 1945.
- [2] BLÁZOVICS, A.: A szabadgyök-kutatás évtizedei és magyar vonatkozásai. *Kaleidoscope*, 8, no. 14. 132-148, 2017. <https://doi.org/10.17107/KH.2017.14.133-148>
- [3] BLÁZOVICS, A., FEHÉR, J.: Növényi alapú táplálkozás és gyógynövények szerepe a szervezet redox homeosztázisában. *Komplementer Medicina*, 6, no. 3. 12-16, 2002.
- [4] FEKE, D. Izotiocianátok jelentősége a rákterápiában. Oxidatív stressz és betegségek. *In: Blázovics, A., Mézes, M., Róth, E.: Természetes hatóanyagok a modern orvoslásban. Gödöllő, Szent István Egyetemi Kiadó Nonprofit Kft. 22-37, 2015.*
- [5] GYÖRGY, I., ANTUS, S., BLÁZOVICS, A., FÖLDIÁK, G.: Substituent effects in the free radical reactions of silybin radiation-induced oxidation of the flavonoid at neutral pH, *Int. J Radiat Biol*, 61, no. 5. 603-609, 1992. <https://doi.org/10.1080/09553009214551411>
- [6] GYÖRGY, I., BLÁZOVICS, A., FEHÉR, J., FÖLDIÁK, G.: Reactions of inorganic free radicals with liver protecting drugs. *Radiat Phys Chem*, 36, no. 2. 165-167, 1990. [https://doi.org/10.1016/1359-0197\(90\)90234-9](https://doi.org/10.1016/1359-0197(90)90234-9)
- [7] PRÓNAI, L., BLÁZOVICS, A., HORVÁTH, É.M., LÁNG, I., FEHÉR, J.: Superoxide activity of dihydroquinoline type derivative (CH 402 and MTDQ-DA). *Free Rad Res Comms*, 19, no. 5. 287-296, 1993. <https://doi.org/10.3109/10715769309056517>
- [8] BLÁZOVICS, A., FEHÉR, J.: Az oxidatív stressz és a máj, pp50-88. *Hepatologia Szerk.: Fehér J., Lengyel G. Medicina, Budapest, 2001.*
- [9] KOCSIS, I., PALLAI, Z., FEHÉR, J., BLÁZOVICS, A.: Az oxidatív károsodás monitorozásának lehetőségei, és a vizsgálatok klinikai vonatkozásai. *Orvosi Hetilap*, 144, no. 47. 2315-2319, 2003.
- [10] FEHÉR, J., CSOMÓS, G., VERECKEI, A.: Free radical reactions in medicine, Springer Verlag, 1987. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-83104-1>
- [11] BLÁZOVICS, A.: A redox-homeosztázis változása és az antioxidánsok jelentősége máj- és bélbetegségekben, MTA Doktora Pályázat, Doktori Értekezés 2005.
- [12] SIROKMÁNY, G., DONKO, A., GEIST, M.: Nox/Duox family of NADPH oxidases: Lessons from knockout mouse model. *Trens Pharmacol Sci*, 37, no. 4. 318-327, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.01.006>
- [13] SUH Y.A.H., ARNOLD, R.S., LASSEGUE, B. SHI, J., XU, X., SORESCU, D., CHUNG, A.B., GRIENGLING, K.K., LAMBETH, J.D.: Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 1999, 401, no. (6748). 79-82.
- [14] ESTABROOK, R.W., WERRINGLOER, J., PETERSON, J.A.: Xenobiotic Metabolism. *In: Paulson, G.D., Frear, D.S., and Marks, E.P.: American Chemical Society, Washington, D.C. "The Use of Animal Subcellular Fractions to Study Type I Metabolism of Xenobiotics."* 149-179, 1979.
- [15] JANSSON, J., SCHENKMAN, J.B.: Studies on three microsomal electron transfer enzyme systems (Specificity of electron flow pathways). *Arch Biochem Biophys*, 178, no. 1. 89-107, 1977. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90174-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90174-6)
- [16] MATKOVICS, B.: Stress reaction answers. Antioxidants in response and repair. *In: Fehér, J., Blázovics, A., Matkovics, B., Mézes, M.: Akadémiai Kiadó, Budapest, 229-235, 1993.*
- [17] KOCSIS, I., BLÁZOVICS, A., PALLAI, Z., FEHÉR, J.: A szervezet redox-egyensúlyának vizsgálati módszerei, lehetséges szerepük a diagnosztikában. *Orvosi Hetilap*, 145, no. 14. 761-767, 2004.
- [18] VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H., REUTELINGSPERGER, C.: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using

fluorescein labelled annexin V. *J Immunol Methods*, 184, no. 1. 39–51, 1995. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-I](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-I)

[19] SUZUKI, T., FUJIKURA, K., HIGASHIYAMA, T., TAKATA, K.: DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J Histochem Cytochem*, 45, no. 1. 49–5, 1997. <https://doi.org/10.1177/002215549704500107>

[20] BEKŐ, G., HAGYMÁSI, K., SZENTMIHÁLYI, K., BÁNYAI, É., OSZTOVITS, J., FODOR, J., FEHÉR, J., BLÁZOVICS, A.: Sex-dependent alterations in erythrocyte trace element levels and antioxidant status after a month of moderate daily red wine consumption. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 22, no. 2. 185-191, 2010.

[21] SZÉKELY, E., SZENTMIHÁLYI, K., TASNÁDI, GY., KURUCZ, T., PALLAI, ZS., SOMOGYI, A., BLÁZOVICS, A.: Element status of total blood and redox homeostasis of phlebotomised sporadic porphyria cutanea tarda patients with diabetes mellitus and heavy drinkers. *Trace Elem Electr*, 23, no. 1. 43-49, 2006. <https://doi.org/10.5414/TEP23043>

[22] BEKŐ, G.: Multiplex szérumbiológiai vizsgálatok jelentősége különböző kórképekben. Doktori értekezés 2009.

[23] BLÁZOVICS, A., SÁRDI, É.: Methodological repertoire development to study the effect of dietary supplementation in cancer therapy. *Microchem J*, 136, 121–127, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.027>

[24] SZENTMIHÁLYI, K., MAY, Z., SZÉNÁSI, G., MÁTHÉ, Cs., SEBESTÉNY, A., ALBERT, M., BLÁZOVICS, A.: Cisplatin administration influences on toxic and non-essential element metabolism in rats. *J Trace Elem Med Biol*, 28, no. 3. 317-321, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.02.005>

[25] BLÁZOVICS, A.: Redox homeostasis, bioactive agents and transduction therapy. *Signal Transduct Ther*, Bentham Sci, 2, no. 3. 226-239, 2007.

[26] HALLAWELL, B.: The antioxidant paradox. *Lancet*, 355, 1179-1180, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02075-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02075-4)

[27] SZENT-GYÖRGYI, A.: 1941, *In*: Nagy I.Z., Semiconduction of proteins as an attribute of the living state: the ideas of Albert Szent-Györgyi revisited in light of the recent knowledge regarding oxygen free radicals. *Exp Gerontol*, 30, 327-335, 1995. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(94\)00043-3](https://doi.org/10.1016/0531-5565(94)00043-3)

[28] SZENT-GYÖRGYI, A.: The living state and cancer. *Proc Nat Acad Sci USA*, 74, 2844-284, 1977. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.7.2844>

[29] McCORD, J.M., FRIDOVICH, I.: Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein), *J Biol Chem*, 244, no. 22. 6049-6055, 1969.

[30] NELSON, N.A., KELLY, R.C., JOHNSON, R.A.: Upjohn Co.: Prostaglandins and the arachidonic acid cascade, Special Report., C and EN, 1982.

[31] McCORD, J.M.: The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*, 108, no. 8. 652- 659 2000. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00412-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00412-5)

[32] ASHFORD, T.P., PORTER, K.R.: Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. 12, no. 1. 198–202, 1962.

[33] HARNETT, M.M., PINEDA, M.A., LATRÉ DE LATÉ, P., EASON, R.J., BESTEIRO, S., HARNETT, W., LANGSLEY, G.: From Christian de Duve to Yoshinori Ohsumi: More to autophagy than just dining at home. *Biomed J*, 40, no. 1. 9-22, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2016.12.004>

[34] HRUBAN, Z., RECHCIGL, M.Jr.: Microbodies and related particles. Acad Press, New York and London 1969.

[35] WILKINSON, K.D.: The discovery of ubiquitin-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, no. 43. 15280–15282, 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504842102>

- [36] BLÁZOVICS, A., KOVÁCS, Á., LUGASI, A., HAGYMÁSI, K., BÍRÓ, L., FEHÉR, J.: Antioxidant defence in erythrocytes and plasma of patients with active and quiescent Chron's disease and ulcerative colitis: a chemiluminescence study. *Clin Chem*, 45. no. 6. 895-896, 1999.
- [37] DASGUPTA, A. : Review of abnormal laboratory test results and toxic effects due to use of herbal medicines. *Am J Clin Pathol*, 12, no. 1. 127-137, 2003. <https://doi.org/10.1309/P024K7VRDDPJCTVN>
- [38] DASGUPTA, A., BERNARD, D.W.: Herbal remedies, effects on clinical laboratory tests. *Arch Pathol Lab Med*, 130. no. 4. 521–528, 2006.
- [39] KOCSIS, I.: Hogyan befolyásolhatják a gyógynövény eredetű hatóanyagok a labordiagnosztikai vizsgálatok eredményeit? Azaz... Jobb félni, mint megijedni! *In: Blázovics, A., Mézes, M., Róth, E.: Természetes hatóanyagok a modern orvoslásban. Gödöllő, Szent István Egyetemi Kiadó Nonprofit Kft. 61-65, 2015.*
- [40] SZENTMIHÁLYI, K.: Gyógynövénykivonatok fémelemtartalom-vizsgálatának jelentősége adjuváns terápiában, *Orvosi Hetilap*, 2018. közlés alatt.