

Lágyszöveti meszesedés egérmodelljének optimalizálása egy új lehetséges kezelési mód tesztelésének érdekében



TDK dolgozat

Szerző: Kutás Adriána

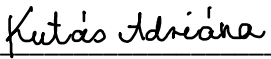
Konzulensek: Dr. Pomozi Viola, Dr. Mucsi Zoltán

Miskolc

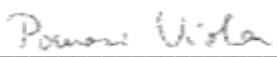
2023.

Igazolás

Alulírott Kutás Adriána igazolom, és a büntetőjogi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a leadott TDK dolgozat a saját munkám.


Kutás Adriána

Alulírott Dr. Pomozi Viola (TTK Enzimológiai Intézet), mint külső témavezető nyilatkozom, hogy Kutás Adriána, „***A lágyszöveti meszesedés egér modelljének optimalizálása egy új lehetséges kezelési mód tesztelésének érdekében***” című dolgozatában ismertetett munkát a hallgató a szakmai irányítással végezte, amely szakmai tartalma alapján beadható.


Dr. Pomozi Viola

Alulírott Dr. Mucsi Zoltán (ME Kémia Intézet), mint belső témavezető nyilatkozom, hogy Kutás Adriána, „***A lágyszöveti meszesedés egér modelljének optimalizálása egy új lehetséges kezelési mód tesztelésének érdekében***” című dolgozatában ismertetett munkát a hallgató a szakmai irányítással végezte, amely szakmai tartalma alapján beadható.


Dr. Mucsi Zoltán

Tartalom

1.	Bevezetés.....	5
2.	Irodalmi összefüggések	6
2.1.	Lágyszöveti meszesedés	6
2.1.1.	Pseudoxanthoma elasticum	6
2.1.2.	Csecsemőkori generalizált artériás meszesedés (GACI).....	8
2.2.	Abcc6 knockout egérmodell.....	9
2.3.	Urtica dioica	10
2.3.1.	Hatás a szív- és érrendszerre.....	10
2.4.	Célkitűzés	11
3.	Téma kidolgozása.....	12
3.1.	Csalánnövény hatóanyagainak kinyerése	12
3.1.1.	Csalánnövényből készített hatóanyagextraktum	13
3.1.2.	Csalánnövényből készített hatóanyagkivonat.....	16
3.2.	Állatkísérlet során hasznított anyagok, eszközök	19
3.2.1.	Anyagok és reagensek.....	19
3.2.2.	Felhasznált eszközök és készülékek	20
3.3.	Abcc6 egereken végzett eljárások és vizsgálatok.....	20
3.3.1.	Labor etikett	20
3.3.2.	Cryo fagyasztás	21
3.3.3.	Ca ²⁺ mérés előkészítése	23
		23
3.3.4.	Ca ²⁺ mérés	24
3.3.5.	StanbioTotal Calcium LiquiColor (No. 0150) reagensek hatásmechanizmusa	24
3.3.6.	PPi mérés vérplazmából	26
4.	Szerzői hozzájárulás	28
5.	Mért és meghatározott eredmények.....	29
5.1.	Adatok ismertetése	29
5.2.	Mérésekhez tartozó számítások	32
6.	Eredmények kiértékelése	34
6.1.	Meszesedés mértéke a lágyszövetben	34
6.2.	PPi mérés eredmények	35
7.	Összegzés.....	37
	Köszönetnyilvánítás	38
	Idézett forrásmunkák.....	39

Rövidítések

ABC	ATP Binding Cassette - ATP-kötő kazetta
ABCC6	ATP-kötő kazetta transzportfehérje család C alcsaládjának 6-os tagja
Abcc6 -/-	abcc6 génkiütött egérmodell
ATN	Akut tubuláris nekrozis
ATP	Adenozin-trifoszfát
BTG	Bactiter-Glo
ENPP1	ektonukleotid pirofoszfátáz/foszfodiészteráz 1 enzim
GACI	Generalized Arterial Calcification of Infancy
OCPC	o-cresolphthalein complexone
Pi	szervetlen foszfát
PPi	szervetlen pirofoszfát
PXE	Pseudoxanthoma elasticum

1. BEVEZETÉS

A lágyszöveti meszesedés meghatározó szerepet tölt be a társadalmunkat érintő egészségügyi problémák terén. A meszesedés legérintettebb területei a bőr, vese, valamint a kardiovaszkuláris szövetek. Öregedéskor, cukorbetegség esetén és egyes genetikai betegségek jelenlétekor lépnek fel ezen kalcifikációk. Ilyen genetikai betegség kiváltói például az *ABCC6* gén mutációi. *ABCC6* hiánya esetén lágyszöveti meszesedés alakul ki, mely a Pseudoxanthoma elasticum (PXE) kiváltója. Ideális lenne egy olyan készítmény fejlesztése, mely képes meggátolni a meszesedést toxikus mellékhatások nélkül. Kísérleteim során egy csalán extraktumot és annak töményebb koncentrátumát készítettem el, mely több hatóanyagot tartalmaz. Az oldat megbízhatóságát és hatásosságát in vivo *Abcc6* knockout egérmodelleken tervezem elvégezni. Ezen egyedek olyan génmódosított állatok, amelyek nem rendelkeznek *Abcc6* génnel, ennek következtében tökéletesek rekonstruálják a humán betegek tüneteit. Kutatásom kereteiben vizsgáltam, hogy milyen egércsoport lenne a legmegfelelőbb a meszesedést gátló hatás preklinikai vizsgálatára. A TTK Enzimológiai Intézet egyik fő profilja az ektopikus meszesedés vizsgálata, így az egerekre vonatkoztatott kísérleteimet ezen intézményben sajátítottam el és valósítottam meg. A kutatócsoport biztosította ezen kívül számomra szakmai háttértudást, lehetséges kezelési módok megvalósítását. E kísérleti tapasztalataim és a laborban való munkálataim jelentették a legnagyobb motivációt egy olyan készítmény lehetséges és új területen történő bevonására is, mely gyógynövény alapú és régóta is ismert. Ennek érdekében egy csalán alapú kivonatot készítettem, ahol menstruum alkohol. A kivonat elkészítési paramétereit, illetve összetételét dolgozatomban részletesen ismertetem. A csalán széles körben alkalmazott növény. Az egyes részekből származó kivonatok ismert jótékony hatással bírnak fertőzések, gyulladások, magas vérnyomás és ízületi problémák esetén. Korábban számos állatkísérletet végeztek ezen hatások preklinikai igazolása érdekében, melynek sikerességeit dolgozatomban összefoglalom, viszont kalcifikációs jelenségek tesztelésére végzett állatkísérletekről jelenleg nincs szakmai adat/ publikáció, így ez mindenképpen új terület. Az optimálási vizsgálatok arra terjedtek ki, hogy az egerek kora és neme befolyásoló tényező-e a meszesedés indukálásakor. Az eredmények meghatározók voltak mind a kutatócsoport mind a kivonat későbbi tesztelésének szempontjából.

Célkitűzéseim közt szerepel az egerek számára ideális (hatékony) dózis meghatározása, majd a hatékonyság vizsgálata az optimalizálás mechanizmusa szerint eljárva, kontroll minták összevetésével. A növényi kivonattal párhuzamosan egy speciális gélformulációs eljárást hoztam létre, mely a hatóanyagok sikeressége esetén, humán fogyasztásra is alkalmas lehet.

2. IRODALMI ÖSSZEFÜGGÉSEK

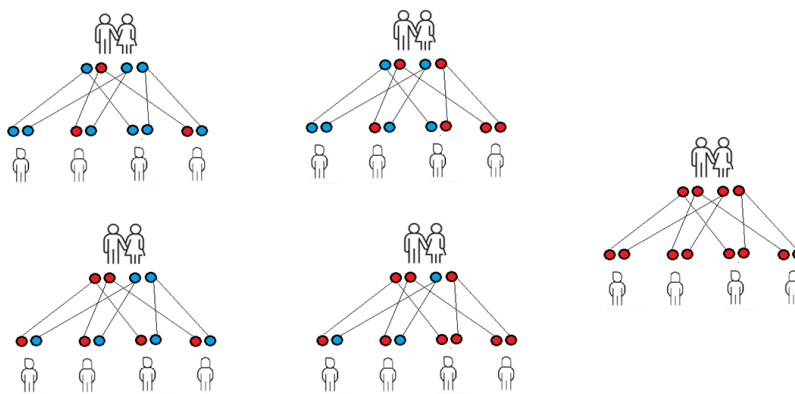
2.1. Lágyszöveti meszesedés

Az ektopikus (lágyszöveti) meszesedés okozta megbetegedés lehet metasztatikus kalcifikáció, disztrófiás kalcifikáció vagy kalcinózis. Metasztatikus kalcifikáció az ép szöveteket érinti. A kiváltó ok a keringésben lévő kalcium és egyéb sók szintemelkedése. A disztrófiás kalcifikáció az igénybe vett, sérült, nekrotikus szövetek esetén jellemző. A legérintettebb területek a bőr, vese, valamint a kardiovaszkuláris szövetek. Öregedéskor, cukorbetegség esetén és egyes genetikai betegségek jelenlétekor lépnek fel ezen kalcifikációk. Ilyen genetikai betegség kiváltói például az ABCC6 gén mutációi. ABCC6 hiánya esetén lágyszöveti meszesedés alakul ki, mely a Pseudoxanthoma elasticum (PXE) kiváltója. [1]

2.1.1. Pseudoxanthoma elasticum

A Pseudoxanthoma elasticum (PXE) egy olyan meszesedési betegség, amelyet autoszomális recesszív öröklődés jellemez. (OMIM # 264800) Ezt a kifejezés humán szervezetre nézve, olyan genetikai kórkép minősítésére használjuk, amelyek adott gén mutációjával hozhatóak összefüggésbe. Maga a megbetegedés akkor válik autoszomális recesszív jellegűvé, ha az érintett gént a 22 autoszóma egyike hordozza. [2] A recesszív jelző arra utal, hogy a mutáció okozta tünetek akkor jelentkeznek, ha mindkét allélon megfigyelhető a mutáció. Amennyiben csak az egyik allél mutáns, a másik pedig egészséges, az illető hordozó potenciálisan tovább örökítheti a betegséget, viszont ő maga nem beteg. Az autoszóma nem-szexuális kromoszóma. Szervezetünket 23 pár kromoszóma építi fel, ezek közül megkülönböztetünk 22 pár homológ autoszómát, illetve a nemi kromoszómát a gonoszómát. Egy nőstény két homológ X kromoszómával rendelkezik. Egy hím pedig egy X és egy Y kromoszómát birtokol.

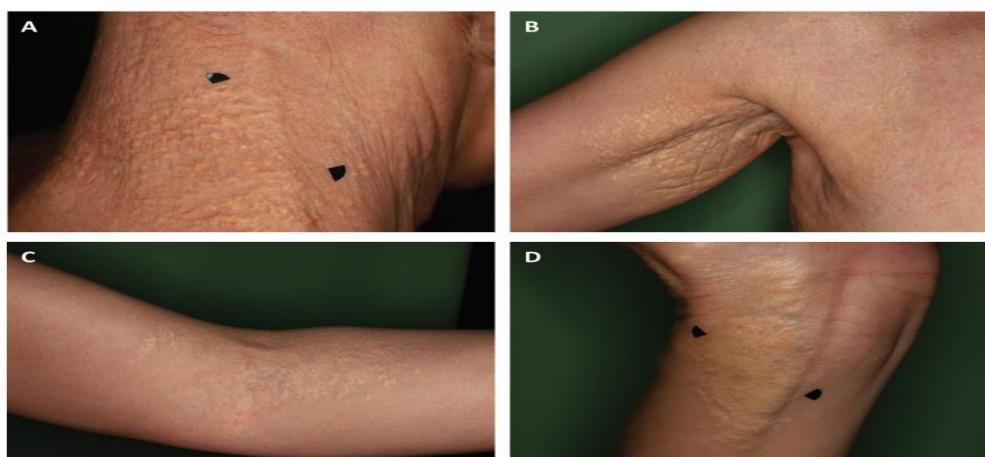
Mivel a PXE-t okozó ABCC6 mutációk autoszómán helyezkednek el, így a betegség kialakulása nemtől független. Az **1. ábrán** a normális (vad típusú) allél ivarsejtjei kék színnel kerülnek feltüntetésre. A rendellenes allélt hordozó ivarsejtek piros színnel vannak ellátva.



1.ábra Autoszomális recesszív öröklődés típusai

A PXE egy régóta ismert veleszületett hiba, mely gyakorisága 1:50 000. Ez nagyjából világszerte 150.000 PXE-ben szenvedő beteget jelent. 2000-ben megállapították, hogy a PXE-t az ABC- transzporter Multidrug Resistance Protein 6 (MRP6), mai nevén *ABCC6* gén mutációi okozza. [3][4]

A PXE tünetei az amorf kalcium-foszfát kicsapódásából erednek, amely fokozatosan hidroxipatittá alakul át. Az általános meszesedés leginkább a bőrt, az ereket és a szemet érinti. a PXE betegekben a meszesedési tüneteken kívül magasabb IL-6 szintet mértek, ami gyulladásos folyamatokra utal. A klinikai lefolyás és az érintettek életkora nagyon eltérő. Egyes betegeknél akár 60 éves korukig csak kisebb szimptómák (látáshiba, kisebb szív-érrendszeri problémák) jelentkeznek. Bizonyos esetekben, már csecsemőkorban meszesedés és szív infarktus lép fel.

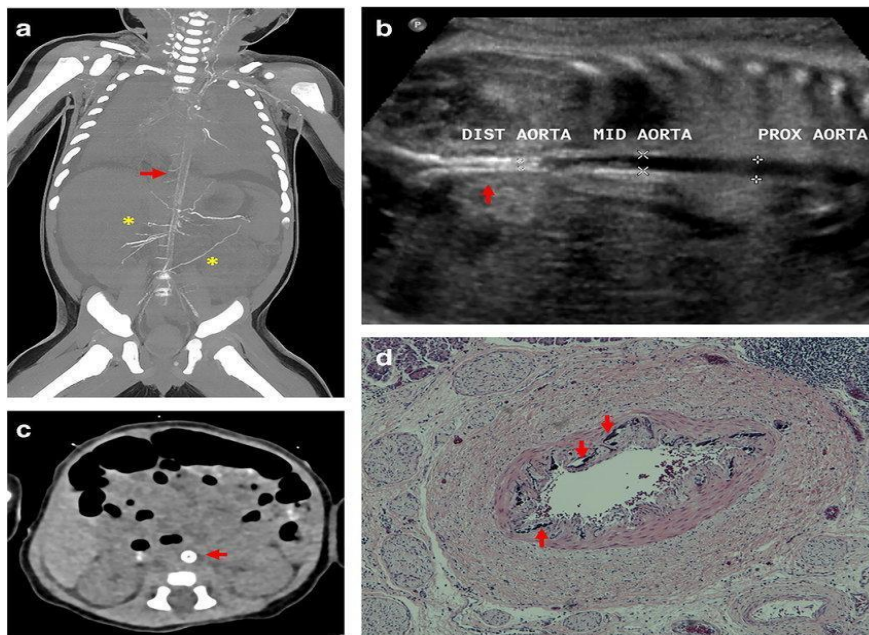


2 ábra PXE megjelenése humán bőr területén

[A Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika képanyaga.]

2.1.2. Csecsemőkori generalizált artériás meszesedés (GACI)

A GACI előfordulási gyakorisága a becslések szerint 1: 391 000. Bár a csecsemőkori halálozás magas, a betegek egy része megéli a 30-40 éves kort. A betegség általában már a magzati fejlődés során jelentkezik. A GACI és a PXE háttérében a vérben lévő alacsony pirofoszfát szintje áll. A pirofoszfát egy olyan szervetlen anion, amely feltehetően megakadályozza a kalciumlerakódások felhalmozódását a lágy szövetekben. Elegendő mennyiség hiányában a kalcium és foszfát elkezd felhalmozódni a szöveti felszínen (ezt nevezzük meszesedésnek), ezáltal az erek elveszítik rugalmasságukat, és korlátozottá válik a véráramlás. A GACI-ban szenvedő újszülöttek születéskor a magas vérnyomás, a szívbetegség és a vesebetegség klinikai tüneteit mutatják. A betegségben szenvedő csecsemők életük korai szakaszában a stroke, a szívroham és a veseelégtelenség kockázatának is ki vannak téve. [5]



3. ábra GACI megjelenése csecsemő szervezetben [5]

Ezeknél a csecsemőknél szívelégtelenség is kialakulhat. Nagy az esély a következő tünetekre:

- Légzési nehézség
- Folyadék felhalmozódása (ödéma) a végtagokban.
- A bőr vagy az ajkak kékes színűvé válása (cianózis).
- Megnagyobbodott szív (kardiomegália)

2.2. Abcc6 knockout egérmodell

A humán betegségek kutatásánál állatmodellek segítik az adott betegség jobb megismerését és az esetleges gyógymódok tesztelését. A génmódosított *Abcc6*^{-/-} egerek a humán PXE betegekhez hasonló tüneteket mutatnak. Kalcifikációs elváltozásokat produkálnak a bőrben, retinában és az artériák elasztikus rostjaiban, vesében. Az első tünetek 5-6 hetes korban jelentkeznek, a bajusz szőrtüszők meszesedésével. A PXE betegekhez hasonlóan, az *Abcc6*^{-/-} egerekben is jelentkezik bizonyos gyulladásos citokinek (IL-6, IL-12, IL-17A) emelkedett szintje. Az *Abcc6* gén hibás működése génmódosítással valósul meg ezen csoportok esetében.

Hátránya, hogy a jelentős elváltozások viszonylag későn jelentkeznek. Az *Abcc6*-hiányos egerek esetén a meszesedés nem csak spontán jellegű (krónikus meszesedés), hanem bizonyos sérülések is kiváltják azt (akut meszesedés). Ilyen indukált meszesedést eredményez a fagyasztásos sérülés [6]. A kutatócsoportban rutinszerűen alkalmazzák ezt a módszert, amikor az egerek szívének rövid és részleges megfagyasztásával indukálják a szívizom meszesedését. Ezzel az eljárással már 3-4 napon belül látható az indukált meszesedés, tehát ez egy gyors és hatékony módja a meszesedés vizsgálatának, és akár esetleges meszesedést gátló gyógyszerek tesztelésének. [7]

2.3. Urtica dioica

A természetes hatóanyagok keveréke, vagy tiszta komponense, akár standardizált növényi kivonatok formájában, korlátlanul kínálnak lehetőségeket más, szintetikus hatóanyagforrások helyettesítésére. A növényi hatóanyagok hatása legtöbb esetben viszont tapasztalaton és feltételezésen alapul, nem köthető hozzá direkt gyógyszerkutatási kísérlet. A csalán (*Urtica dioica*) egy egyedülálló lágyszárú évelő virágos növény, amelynek szúrós szőrszállai vannak. A csalánméreg elsősorban hisztamint tartalmaz, továbbá hangyasavat, kovasavat és acetilkolint. A levelének kivonata széles körben alkalmazott, hagyományosan a szív- és érrendszeri rendellenességekre tesztelték, különösen a magas vérnyomás kezelésére. [8]

2.3.1. Hatás a szív- és érrendszerre

Testai és munkatársai (2002) a kivonatok kardiovaszkuláris hatásait vizsgálták. A következő készítményeket az alábbi körülmények közt végezték: endotheliummal, illetve anélkül. A gyökerek vizes és metanolos kivonatai kerültek tesztelésre. [9] A készítmény endothelium jelenlétében értágító hatást mutatott, viszont nélküle nem volt megfigyelhető.

Ugyanez a frakció tengerimalacok esetében is hatásosnak bizonyult. Ezek az eredmények alátámasztották, hogy a csalán képes csökkenteni a vérnyomást értágító hatások révén. Arra a következtetésre jutottak, hogy az *Urtica dioica* trombocitaellenes hatással rendelkezik, amelyben általában a flavonoidok játszanak szerepet. A csalán nem gyakorolt változást a vérnyomásra egerekben, míg macskákban kifejezett vérnyomáscsökkentő volt és bradycardiát okozott.

Tahri és munkatársai további tesztek végeztek patkányok bevonásával. Csalánlevél kivonatot alkalmaztak 4 mg/kg/h és 24 mg/kg/h koncentrációjú dózisokban. [10] Eredményei az *Urtica dioica* akut vérnyomáscsökkentést mutattak, azonban reverzibilis volt. A beadás után 1 óra elteltével az alacsony koncentráció esetén megszűnt, míg a magas hatáskoncentráció esetében fennmaradt, ami egy lehetséges toxikus hatásra utal. [11]

Wagner a csalán gyökér vizes extraktumával végzett vizsgálatokat. Amely gátló hatást fejtett ki patkánymancsödéma ellen. [12] A dozírozást orális módon oldották meg, majd 5 óra elteltével a gyulladáscsökkentőhatás hasonló volt, mint az indometacin alkalmazásakor. Az indometacin szteroidot nem tartalmazó gyulladáscsökkentő. Láz, gyulladás, izommerevség, duzzanatok és gyulladások kezelésére alkalmas. A csalán gyulladáscsökkentő aktivitása a ciklooxygenázzal, lipoxigenázzal és a citokintermeléssel hozható összefüggésbe.

2.4. Célkitűzés

TTK Enzimológiai Intézet kutatócsoportjában lehetőségem nyílt a légyszövetek meszesedését és ezek kezelésének lehetőségeit vizsgálni. Fokozott érdeklődést mutattam mindig a gyógyszeripar és a termékfejlesztések felé. Sokat olvastam gyógynövényekről és arról, hogy egyes személyekre milyen hatást gyakoroltak, viszont valami kézzelfogható magyarázatot szerettem volna kapni. Választásom azért a csalánra esett, mert az egyik legsokoldalúbb növény. Gyomnövényként említik legtöbb esetben és korlátlan mennyiségben megtalálható lakóhelyem közelében, emiatt ideálisnak tűnt kutatásaimat erre alapozni. A növény tömördek készítményben megtalálható mind kozmetikai termékek esetén mind élelmiszeripari termékek színezőjeként. Leggyakrabban mégis teaként fogyasztják, de megtalálható a piacon tablettás készítmény is. Céлом egy olyan csalán hatóanyagot tartalmazó készítmény fejlesztése volt, mely magába foglalja a humán szervezet számára ajánlott napi bevitelt. Emellett biztosítja a maximális felszívódást, amellyel, hogy a szervezet számára könnyen lebontható. Nem utolsó sorban pedig kellemes élményt nyújt fogyasztója számára. Mivel ez a készítmény étrendkiegészítőnek minősül, jelentős mennyiségű szempontot figyelembe kell venni ahhoz, hogy egy tényleges terméké válhasson. Fontosnak tartom, hogy a fogyasztók számára 100 %-ban azt nyújthassa később, amit a készítő garantál. A jelenlegi piacon túlságosan nagy a választék az étrendkiegészítők terén, viszont legtöbbje nem teljesíti az elvárt hatásokat. A gyártó felelősséget vállal a toxikus hatásokkal szemben, viszont nem köteles direkt kísérletekkel alátámasztani terméke hatékonyságát. Ennek elkerülése érdekében készítményem in vivo Abcc6 knockout egérmodelleken kívánom tesztelni, viszont ezt a kísérletet számos előmunkálat előzi meg. Dolgozatom témája egyrészt a csalán hatóanyagot tartalmazó extraktum előállításának optimalizálása, valamint az in vivo vizsgálatokhoz szükséges légyszöveti meszesedésre alkalmas egérmodell optimalizálása. Ez azért fontos, hogy később tudjam azt, hogy melyik egércsoportokat szükséges bevonnom a hatóanyag hatásának kutatására. Későbbiekben szeretném meghatározni az egerek számára megfelelő dózist az általam készített kivonatból, hogy preklinikai vizsgálatokat végezhessek. Vizsgálataim pedig egy képet adnának arról, hogy a csalán képes-e csökkenteni vagy gátolni a légyszöveti meszesedést. Amennyiben hatékonyak bizonyulnának egérvizsgálatokban, szeretném humán fogyasztásra is előterjeszteni.

3. TÉMA KIDOLGOZÁSA

3.1. Csalánnövény hatóanyagainak kinyerése

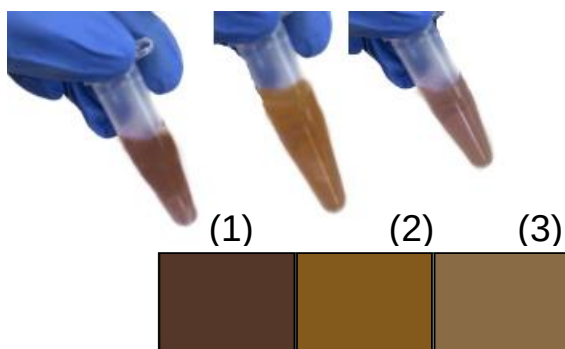
A gyógynövényeket legtöbb esetben extraktumként, tea formájában fogyasztjuk. Fontos megemlíteni, hogy ezen készítményekből napi többszöri bevitel ajánlott a hatás elérése érdekében. Gyógynövények esetén nehéz állandó hatást elérni, ugyanis több tényezőtől függ a minősége. Meghatározó a származási hely, a kor, illetve a leszedésének dátuma. A csalán esetén célszerű közvetlenül a virágzás előtt leszedni, esetlegesen röviddel azután. A levelek tartalmazzák a legnagyobb koncentrációban az aktív hatóanyagokat, a friss hajtások alkalmasak a fogyasztásra. Ezen levelek mélyzöld színűek, még az idősebb hajtások világosabbak, ezekben megnő a nitrogéntartalom, ezért alkalmazása nem ajánlott. Az általam készített extraktumhoz és kivonathoz Borsod Abaúj Zemplén Vármegye térségéből származó növényt gyűjtöttem be, június hónapban. Mindkét kivitelezés esetében azonos napon és helyen szedett anyagot dolgoztam fel a hatóanyagtartalom szórásának minimalizálása céljából. A csalánt Alsógagyban szedtem forgalomtól mentes, félárnyékos területen.

Amennyiben extraktumként kívánjuk fogyasztani a csalánt, mint már említettem napi többször célszerű ezt megejtenünk. Ízesítés nélküli fogyasztása az ajánlott, alapíze viszont nem túl kellemes. A piacon megtalálhatóak tablettás készítmények, ezek viszont adalékanyagokat, térfogatnövelőket tartalmaznak, melyek a szervezetünk számára nehezen lebonthatók. Ezáltal a felszívódási mechanizmus is lassabb és gyengébb. Ekkor fogalmazódott meg bennem a kérdés: Hogyan lehetne egy olyan készítményt létrehozni, amely lefedi egy kapszulában a napi szükségletet, mindemellett kellemes ízű és nem tartalmaz mesterséges adalékanyagot? Kérdésem válaszáként egy speciális gélformulációt kezdtem kifejleszteni. Fontos szempont volt számomra, hogy a gélképzés során a hatóanyagot képző komponens extraktumként vagy egy koncentráltabb kivonatként kerüljön be a rendszerbe. Ezen vizsgálatokhoz a szedett csalánok leveleit eltávolítottam a szárról, majd napon kiszáritottam őket. A száradást követően minél kisebb részekre aprítottam, ennek célja a fajlagos felület növelése volt. Minél nagyobb felület érintkezik az extrakció során a vízzel vagy az alkohollal annál koncentráltabb oldatot kaphatok.

3.1.1. Csalánnövényből készített hatóanyagextraktum

Extrakció során, olyan szétválasztási műveletet hajtottam végre, amely segítségével szilárd anyagból a megfelelő oldószer alkalmazásával, a kinyerni kívánt komponenseket nyertem ki. Az extrakcióhoz először forró vizet alkalmaztam oldószerként. Forralás hatására a levelekből a hatóanyagok kioldódnak, azonban a hővel extrahált gyógynövény származékok extraktumai csak 24 órán belül fogyaszthatók. Ennek oka, hogy a spóráképző fajok a forralási hőmérsékleten benne maradnak a kinyert mixtúrában és minőségromlást okoznak.

A drogériákban kapható szárított csalánlevelek csomagolásán feltüntetik a használati javaslatot. Ezek alapján 3 g teát 250 ml vízzel szükséges leforrázni. Első-sorban megvizsgáltam, hogy a feltüntetett vízmennyiség meddig redukálható, azaz mekkora minimális mennyiségű víz szükséges, mivel így jóval töményebb oldathoz jutok. Ez alapján 3 üvegpohárba kimértem 3-3 g általam szárított és aprított levelet, majd leforráztam 250, 150 és 50 ml vízzel. A mérések során a következő színskálát kaptam.



4.ábra Extraktumok színe az adagolt víz mennyiségének függvényében

(1): 3 g csalánlevél és 50 ml víz

(2): 3g csalánlevél és 150 ml víz

(3): 3g csalánlevél és 250 ml víz

Az első mintán **(1)** látszik, hogy lényegesen mélyebb barna szín tapasztalható. Ebben az esetben egy koncentráltabb oldatot kaptam, viszont a csökkentett víz térfogat miatt nehezen szűrhető. A levelek viszonylag nagy mennyiségű vizet szívnak fel, így célszerű volt egy olyan módszer bevonása is, amely csökkenti a szilárd komponensek mennyiségét az oldatban, de minél koncentráltabb extraktumot eredményez.

Ennek érdekében az extrahálást kotyogós kávéfőző segítségével készítettem, így értem el a lehető legmagasabb forralási hőmérsékletet is. Mechanizmusát tekintve a gőzzé átalakuló víz

áthatol a kávé tartórészbe helyezett csalan őrleményen, a feszítőerő hatására. Majd lecsapódik, a felül elhelyezkedő tartályban összegyűlik. Ekkor a gőz nyomása alig haladja meg az 1 bárt, minél kisebb lángon főzzük annál jobban oldható a szárazanyag tartalom.

A gélképzés előtt a spóráképzők eltávolítása miatt az oldatot 100°C, 150°C és 200°C-os közegben hevítettem először 10, 15 majd 20 percig. A 100 °C-on végzett kísérlet során 3-4 nap elteltével minden esetben penészedés volt tapasztalható a gélen. 150 °C-on ez az időintervallum 7-9 nap közé esett, majd 200 °C-on 20 percig kezelt gél, amely 2023.04.20.-án készült, azóta még mindig fogyasztható minőségű. Tesztelés szempontjából a gélkockákat egy műanyag dobozban tárolom, melyet rendszeresen kinyitok és levegő éri. Ezzel a módszerrel vizsgálni tudom a gél steril közegének megszakításakor fellépő esetleges reakciókat a levegő hatására. Hátránya, hogy egy kapszula nem tartalmazza a napi szükségletre vonatkozó mennyiséget. A beoldott hatóanyag tartalmú extraktum térfogata bepárlással csökkenthető lenne, viszont túlságosan költséges és időigényes lenne meglátásom szerint.

A vizes és alkoholos extraktumokat HPLC-MS vizsgálatoknak is alávetettük. Vizsgáltuk a hatóanyag összetételét és koncentrációját, azonban csak az előzetes mérésekig jutottam.

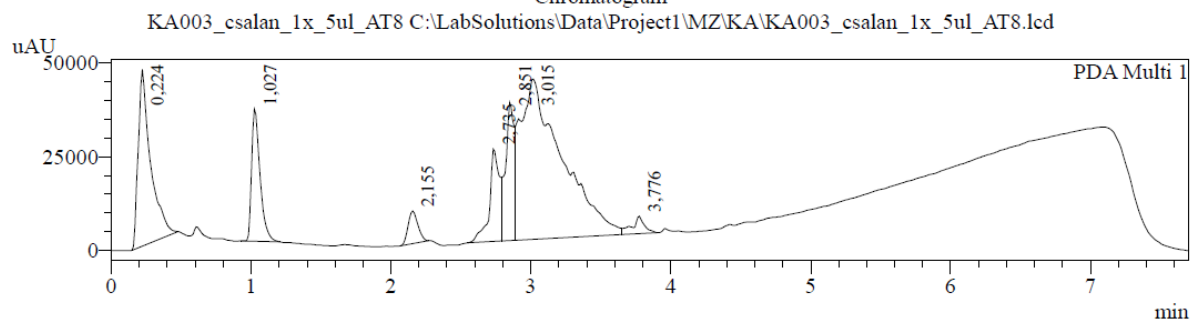
A HPLC vizsgálatok során az extraktumot vízzel 10x-ére hígítottam, majd a kapott oldatból 5 µl-t injektáltam a HPLC-rendszerbe. A kapott kromatogram alapján igen komplex elegyet kaptam, melyben számos komponens található. Balról az első két csúcs igen vízoldható molekula, de az ezt követő vegyületek sajnos egy kupacban, jelentős csúcsátfedéssel eluálódtak, ami arra utal, hogy ezek rokon vegyületek is lehetnek. Az UV-VIS spektrumuk nem jellemző. Sajnos a tömegspektrometriás mérés során nem kaptam értelmezhető adatot, így az egyes komponensek azonosítása nem történt meg.

A jellemző HPLC kromatogram a következő oldalon került beszállásra.

Sample Information

Acquired by : System Administrator
 Sample Name : KA003_csalan_1x_5ul_AT8
 Sample ID :
 Tray# : 1
 Vial# : 38
 Injection Volume : 5 uL
 Data Filename : KA003_csalan_1x_5ul_AT8.lcd
 Method Filename : Col1_TFA_8min.lcm
 Batch Filename : 20230428.lcb
 Report Filename : DEFAULT.lsr
 Date Acquired : 5/5/2023 4:09:08 PM
 Data Processed : 5/5/2023 4:16:53 PM

Chromatogram

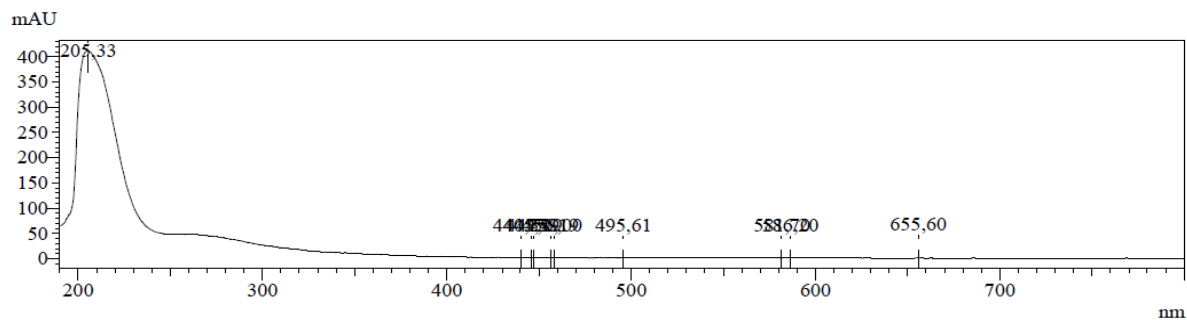


PeakTable C:\LabSolutions\Data\Project1\MZ\KA\KA003_csalan_1x_5ul_AT8.lcd

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0,224	290755	46993	17,342	23,552
2	1,027	145857	35195	8,699	17,639
3	2,155	43026	8692	2,566	4,356
4	2,735	130842	24585	7,804	12,321
5	2,851	163003	36796	9,722	18,441
6	3,015	874870	42632	52,180	21,366
7	3,776	28284	4639	1,687	2,325
Total		1676637	199533	100,000	100,000

Peak# : 1
 Retention Time : 0,224 min
 Compound Name :
 Spectrum Operation : None



5. ábra Csalán extraktum HPLC kromatogram

3.1.2. Csalánnövényből készített hatóanyagkivonat

A forró vizes extraktum hibájának kiküszöbölése céljából választottam új megoldási módot, mely során a növényi részeket szobahőmérsékleten adott ideig alkoholban áztattam. Az alkoholos kivonat előnye, hogy csökkenti a mikroorganizmusok számát a rendszerben, kisebb az esély a penészedésre. Annyi alkoholt adtam a rendszerhez, még az el nem lepte a szilárd fázist. Üveg edényben tároltam 6 héten keresztül szobahőmérsékleten, fénytől elzárt helyen. Az edényt lezártam, hogy megakadályozzam az alkoholvesztést. A kioldódási idő elteltével, a szilárd fázis eltávolítása céljából leszűrtem az oldatot. Ezt követően 1 napig állni hagytam, hogy a fennmaradt por leülepedjen, majd a tiszta felülúszót átöntöttem egy másik tárolóba. A fenti eljárásokkal a vizes extraktumhoz képest egy lényegesen koncentráltabb oldatot kaptam eredményül. A piacon megtalálhatóak növényi tinktúra néven ehhez hasonló készítmények. Adagolásuk napi 2x 1,4 ml, ami nagyjából 35 cseppnek felel meg. Ebben az esetben olyan térfogatú mintatartót választottam melybe belefér a megfelelő mennyiségű kivonat, gélképző, illetve az ízesítés jellegét adó oldat. A pontos mennyiséget a kivonat adagolásakor steril pasteur pipetta segítségével mértem ki. Ezt követően a korábbiakban leírt elkészítési mód szerint jártam el. Az elkészült gél esetén úgy ítélt meg, hogy az alkoholos íz számomra még kellemetlenül érződik, ezt szerettem volna korrigálni. Normál körülmények közt a víz 100°C-on forr míg az etilalkohol 78,3 °C-on. Mivel a két komponens korlátlanul elegyedek egymással, a képzett elegy forráspontja a két komponens forráspont értéke közé esik. Befolyásoló az alkotók elegyedési aránya. Esetemben a hatóanyagok kioldásakor nem kívántam csökkenteni a szeszfokot, viszont úgy ítélt meg fogyasztáskor alkalmasabbnak bizonyulhat az alacsonyabb alkohol tartalom. Emiatt a leszűrt kivonatot elkezdtem forralni míg az le nem csökkent. A gélformulációs eljárást elvégeztem a növényi kivonatból, mely ismételt sikeresnek bizonyult.

Következő lépés a kifejtett hatás tesztelésének megtervezése volt. A gyógynövény kivonatot in vivo egérmodelleken kívánom későbbiekben tesztelni. Elengedhetetlen a hatóanyagok aktivitásának vizsgálatára az egércsoport optimalizálása. Mivel a készítményt ektopikus meszesedés gátlására tervezem alkalmazni, Abcc6 knockout egereket használtam az optimálás során. Ez a csoport esetén szívfagyasztással indukálhatóak a kalcifikációs jelenségek, ezáltal ami humán szervezetben akár több évtized is lehet, egérkísérleteinkben ez az időintervallum lényegesen lerövidíthető. Az optimálási vizsgálat módszereit és kivitelezését szeretném a következő pontokban ismertetni.

A kapott alkoholos kivonatot HPLC-MS vizsgálatoknak vetettük alá. Vizsgáltuk a hatóanyag összetételét és koncentrációját, azonban csak az előzetes mérésekig jutottam.

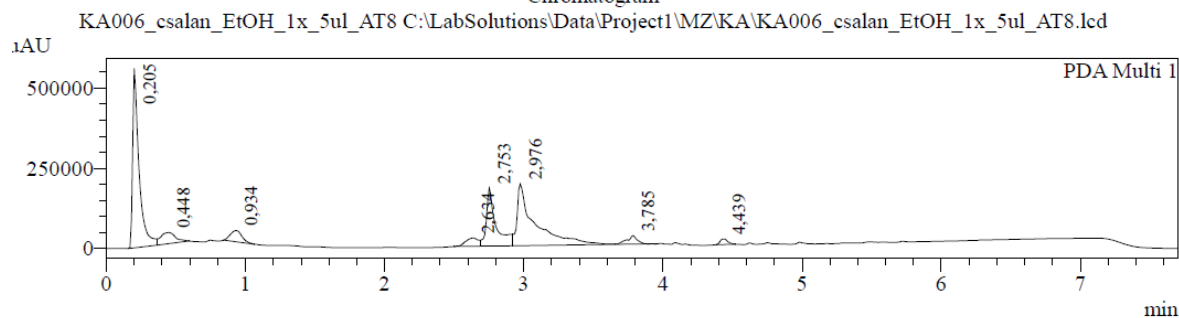
A HPLC vizsgálatok során az alkoholos kivonatot 10x-ére hígítottam, majd a kapott oldatból 5 μ l-t injektáltam a HPLC-rendszerbe. Jelen esetben szintén arra következtethettem, hogy a kapott kromatogram alapján igen komplex elegyet kaptam, melyben számos komponens található. Az előző extraktummal szemben, azonban ez a kromatogram lényegesen kevesebb komponenst tartalmaz és a csúcsok jobban el is különültek. Az UV-VIS spektrumuk alapján a kivonatban más anyagi összetétel található, mint az extraktumban. Sajnos a tömegspektrometriás mérés során itt sem kaptam értelmezhető adatot, így az egyes komponensek azonosítása nem történt meg.

A jellemző HPLC kromatogram a következő oldalon került beszállásra.

Sample Information

Acquired by : System Administrator
 Sample Name : KA006_csalan_EtOH_1x_5ul_AT8
 Sample ID :
 Tray# : 1
 Vial# : 43
 Injection Volume : 5 uL
 Data Filename : KA006_csalan_EtOH_1x_5ul_AT8.lcd
 Method Filename : Col1_TFA_8min.lcm
 Batch Filename : 20230428.lcb
 Report Filename : DEFAULT.lsr
 Date Acquired : 5/5/2023 5:00:23 PM
 Data Processed : 11/14/2023 11:59:22 PM

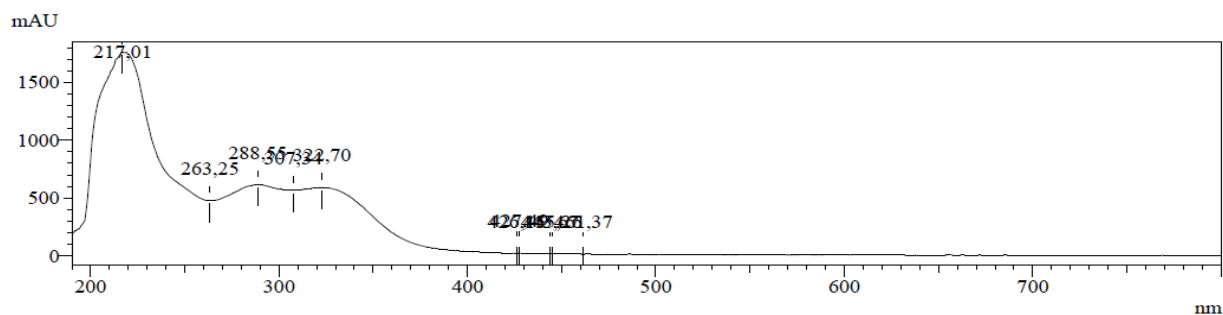
Chromatogram



PeakTable C:\LabSolutions\Data\Project1\MZ\KA\KA006_csalan_EtOH_1x_5ul_AT8.lcd
PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.205	1799453	558075	34.585	52.245
2	0.448	264033	34659	5.075	3.245
3	0.934	197696	34839	3.800	3.262
4	2.634	165682	25705	3.184	2.406
5	2.753	879617	179588	16.906	16.812
6	2.976	1699208	191562	32.658	17.933
7	3.785	130472	26886	2.508	2.517
8	4.439	66816	16867	1.284	1.579
Total		5202976	1068182	100.000	100.000

Peak# : 1
 Retention Time : 0.205 min
 Compound Name :
 Spectrum Operation : None



6. ábra Csalán kivonat HPLC kromatogram

3.2. Állatkísérlet során hasznosított anyagok, eszközök

3.2.1. Anyagok és reagensek

Szívfagyasztás és feltáró műtétek:

- 30,0 mg/kg tiletamin/zolazepam
- 12,5 mg/kg xilazin
- 3,0 mg/kg butorfanol)
- foszfát pufferelt sóoldat

Kalcium mennyiségének meghatározása:

- Alizarin Red S festék (Sigma-Aldrich)
- NH_4OH (Reanal)
- 0,15 M HCl (Reanal)
- StanBioTotal Calcium Liquicolor kit segítségével (StanBio Laboratory, TX):

Pirofoszfát mérése vérplazmából:

- 10 U/ ml ATPS (R&D Systems)
- 1 mM MgCl_2 (Reanal)
- 2 mM APS (Santa Cruz)
- 0,5 M Hepes pH 7,4 (Sigma)
- a kalibráló sorhoz használt standardek (Sigma)
- Bactiter-Glo (Promega, USA)

3.2.2. Felhasznált eszközök és készülékek

- ollók, csipeszek (Eickemeyer)
- M302 típusú UV-VIS spektrofotométer
- Seisystem Bio Centrifuga (Servintern), 24 eppendorf-lyukú rotorral (Heraeus Sepatech)
- 2720 Thermal Cycler típusú PCR készülék (Applied Biosystems)
- Enspire Multimode Plate Reader (PerkinElmer)
- HPLC-mérésekhez egy Shimadzu LC-40D XR UPLC-MS rendszert alkalmaztam, mely SIL-40C XR automata mintaadagolóval, SPD-M40 fotodiódasoros detektorral, RF-20A XS fluoreszcens detektorral, valamint negatív és pozitív ionizációs üzemmódban működő LCMS-2020 DUIS tömegspektrométerrel rendelkezett. Az elválasztás Ascentis® Express C18, 2 µm UHPLC oszlopon (L × I.D. 5 cm × 2.1 mm) történt, 50 °C-on, amelyet egy CTO-40s oszlopkemence biztosított. Gradiens elúciót használtam 0,1 V/V% TFA-t tartalmazó vízben (A) és 0,1 V/V% TFA-t tartalmazó MeCN ben (B).

3.3. Abcc6 egereken végzett eljárások és vizsgálatok

3.3.1. Labor etikett

Mint minden labormunka esetében, a TTK-n is szigorú előírások vonatkoznak a dolgozókra. Kötelező a gumikesztyű viselete a laborba lépés pillanatától. Az egerekkel végzett vizsgálatok során köpeny és védőmaszk használata elengedhetetlen, higiéniai szempontokból és a fertőzés minimalizálása miatt. Az Enzimológiai Intézet folyosóján tekinthetjük meg az egerek tartására kijelölt helységet. Az állatok rendszeresen kapnak enni, inni, megvonás nélkül, ketrecük cédulákkal van ellátva. A cédulákra feltüntetésre kerül a ketrecszám, születési idő, nem, illetve, hogy melyik ketrectől lettek elválasztva. A hímek és nőstények csak tenyésztéskor kerülnek egy ketrecbe. Egérrel való kísérletek során fontos az egyedek megjelölése. Ez a farkukon vonalak feltüntetésével valósul meg. Az egyes vonalak számokat takarnak, amiket a ketrecszám mögé írva jelzünk a jegyzőkönyvben. Ezt a 7. *ábra* (Farokjelöléssel ellátott egerek) szemlélteti.



7. ábra Farokjelöléssel ellátott egerek

[saját kép]

3.3.2. Cryo fagyasztás

Az *Abcc6*^{-/-} egerekben a dystrophiás szívmeszesedés indukálásához fagyasztásos sérülést okoztunk a szívizomnak. Az állatokat az eljárás teljes időtartama alatt általános altatásban és érzéstelenítésben tartottuk. Az altató összetétele 30 mg/kg tiletamin/zolazepam, 12,5 mg/kg xilazin és 3 mg/kg butorfanol. Fontos, hogy altatás előtt megjelöljük az egeret és dokumentáljuk a súlyát, mivel az altató mennyiségének beadása súlyra vonatkoztatott.

Az altató beadása után 10 perccel általában az állatok már alszanak, a nyugalmi állapotot viszont minden esetben ellenőrizzük! Ehhez egy sebészi csipeszt alkalmazunk, mellyen határozott mozdulattal megcsípjük az egerek lábujjközét. Amennyiben az mozgást mutat, rángani kezd, még további 5 percet várunk. A megfelelő nyugalmi állapot elérése után folytathattuk az eljárás további lépéseit. A hasi területet alkohollal fertőtlenítettük. Lehetővé teszi, hogy a szőr könnyebben eltávolítható legyen a borotválás során. A leborotválást követően a bőrt és a hashártyát egy ~ 2 cm-es középvonalbeli bemetszéssel megnyitottuk, felfedve a májat és a beleket. Egy műanyag félcsövet helyeztünk be a hasüregbe, amely a műtét következő szakaszára biztonságos távolságban tartotta a belső szerveket. A cső végén a rekeszizmon keresztül láthatóvá válik a dobogó szív. A csövön keresztül egy folyékony nitrogénben lehűtött tompa acélrudat vezettünk be, és a rekeszizmon keresztül 10 másodpercig megérintettük az állat szívét. A rúd és a műanyag cső eltávolításra kerül ezután. A használatban lévő rudat két kísérlet között fertőtlenítés céljából mindig forró víz alá helyezzük, majd szárazra töröljük, ezzel eltávolítjuk az esetleges szennyezőket.

A hashártyán és a bőrön lévő sebet a fagyasztást követően felszívódó varratokkal zártuk. Varráskor az izmot 5 öltéssel, majd a bőrt folytonosan varrtuk össze (6. ábra). Az állatokat visszahelyeztük a ketrecükbe. Szemükbe foszfát pufferelt sóoldatot csepegtettünk, a nedvesség fenntartása érdekében. Hagytuk, hogy megfigyelés mellett felépüljenek. A fagyasztás folyamatát szakképzett operátor végzi, az eljárás túlélési aránya >90%.



8. ábra Altatott egér szív fagyasztás után összezárva

[saját kép]

A fagyasztás után négy nappal a műtéten átesett egyedeket feltártam. A folyamat előtt altatást végeztünk, a mellkas területét és a has területének felületét alkohollal befújtam. Első körben eltávolítottam a mellkasi részből a bőrt és a hozzátartozó szőrt egy sebészi olló és csipesz segítségével. Egy steril fecskendőt a megfelelő szögben a bordák között beleszúrtam a még dobogó szívbe, majd vért vettem. A mintát CTAD alvadásgátlóval ellátott Eppendorfcsőbe helyeztem, majd jégre tettem. A vér levétele után legtöbb esetben a légzés összeomlik. A következő lépésben feltártam a hasi részt, bemetszést ejtve a bordák alatti területen először a bőr majd az izomszövetbe. Kétoldalt felfelé a bordákat és a felette lévő bőrt átvágva szabaddá tettem a mellkasüreget, majd eltávolítottam a szívet. A szíveket foszfát pufferelt sóoldatban átmostam, hogy a szövetmintát (amennyire lehet) megtisztítsam a vértől (7-8. ábra). Eltávolítottam fennmaradt aorta maradványokat és más esetleges szöveteket is, majd a megtisztított szívet egy feliratozott Eppendorf csőbe helyeztem.



9. ábra Feltárt egér, meszesedést mutató szív
[saját kép]

3.3.3. Ca^{2+} mérés előkészítése

Táramérleggel a szív minták súlyát dokumentáltam. Az állatoktól vett filtrált plazma és szövetmintákat felhasználásig fagyasztva tároljuk. Ca^{2+} mérés előkészítésekor minden mintához 200-200 μl 0,15 N HCl oldatot adtam. A sósav a szövetekből kioldja a kalciumot, mely megfelelő reagens alkalmazásával 550 nm-en spektrofotométerrel mérhető. A HCl kipipettázását követően sebészeti olló segítségével feldaraboltam a mintákat, majd 48 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubálni hagytam. Az aprítással növelhető a fajlagos felület, ezzel a kioldódás folyamata gyorsítható.



10. ábra Különböző mértékben meszesedő szívek
[saját kép]

3.3.4. Ca^{2+} mérés

A Ca^{2+} méréshez az előzőleg elkészített mintákat 13000g-n 10 percig centrifugáltam, mely következtében a szilárd szövetállomány és a folyadék fázis elkülönült egymástól. A mérés során szükséges egy Calcium Liquicolor mixture oldat készítése. Ehhez 1:1 arányban mértem ki a Total Calcium Base Reagent (Cat.No.0152) és Total Calcium Color Reagent (Cat.No.0151) reagensekből. Előkészítettem a mintákkal megegyező számú Eppendorf csövet, melyekbe a mix oldatból 1-1 ml mennyiséget pipettáztam. A mix oldathoz 10-10 μl -t szuszpendáltam a szívpreparátumok mintáinak felülúszóiból. OCPC indikátort használunk ennél a mérésnél, mely lila színreakciót ad alkalikus közegben. Ennek oka a kalciummal való komplexképzés. Ebből következik, hogy a szín erőteljessége egyenesen arányos a szövetállomány kalciumtartalmának mennyiségével.

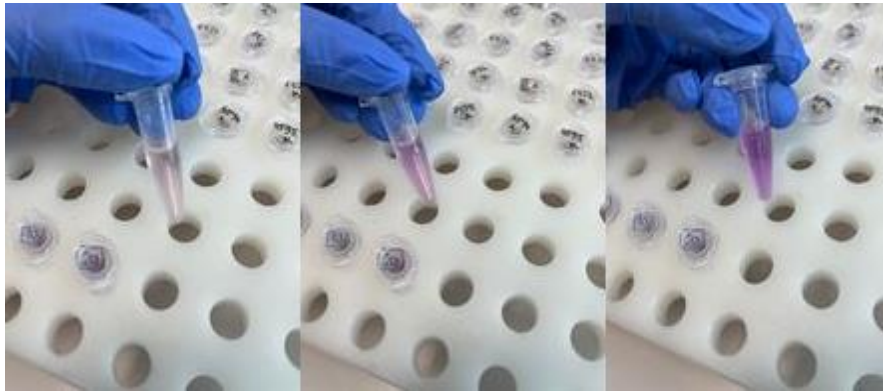
A minták mellett elengedhetetlen egy kalibrációs sor készítése, mely 5 tagból áll: vak (az üres reagens mix, hozzáadott kalcium nélkül), 2,5 μl 5 μl , 10 μl , 20 μl kalcium tartalom. A kalibrációs sorhoz Total Calcium Standard (10mg/dl) (Cat.No.0153) oldatot használtam.

3.3.5. StanbioTotal Calcium LiquiColor (No. 0150) reagensek hatásmechanizmusa

Vizeletben, plazmában és szérumban lévő összes kalcium kvantitatív kolorimetriás meghatározására használt vegyületek. A kalcium disszociál a proteinsavas oldatban, majd közvetlen reakcióba lép az OCPC indikátorral. Így lúgos közegben Ca-OCPC komplex képződik, amely lila színű.

- Color Reagent: o-cresolphthalein complexone (0,10 mmol/L), 8-hidroxiquinoline (17,2 mmol/L), hidroklorid oldatban
- Base Reagent: 2-amino-2methyl-1-propanol (970 mmol/L) vizes oldata
- Standard: 10 mg/dl kalcium In vitro diagnosztikai vizsgálatra

A szín és bázis reagens keveredés során válik munkareagenssé. A mérést megelőzően a reagens hőmérsékletének 25 °C-nak kell lennie. A reagensek és a minta adagolása során fokozottan figyelni kell arra, hogy ne kerüljön szennyező egyik mintatartóba sem. Amennyiben a minta koncentrációja a kalibrációs sor által meghatározott tartomány fölé esik, a mintát hígítani kell, mivel magasabb koncentrációnál már nem lineáris az abszorbancia növekedése. A mintákhoz mindig készül egy kalibrációs sor.



11. ábra OCPC indikátor komplexképző fokozatai

Az ábra olyan egerek HCL-ban kioldott szövetmintáinak oldatát mutatja, melyek közt jelentős eltérés figyelhető meg. Az első képen alig tűnik fel a lila szín, ez a mérsékelt kalcium tartalomra utal. A középső képen egy koncentráltabb minta látható, viszont a jellegzetes lila szín még mindig nem teljesedik ki. A harmadik képen jellegzetes színjelenség tapasztalható, ami jelentős kalcifikációs jelenségre hívja fel a figyelmet.

A spektrofotometriás mérés során először a vak mintával 0- ra kalibráltam a fotométert.. Ezt követően a minták és standardek abszorbanáciáját 550 nm-en kvantifikáltam. Célszerű két mérést végezni, az értékek pontossága miatt. Az utolsó tag után átmostam a küvétát a vakkal. A mintákat a lila szín intenzitás növekedésének sorrendjében mértem. Szintén végeztem párhuzamos mérést. A mért értékeket lementettem, majd Prism6 segítségével kiértékelést végeztem. Az adatokat Excel táblázatba is dokumentáltam, majd kalibrációs egyenest készítettem. Lineáris regresszióval a program kiszámolta az egyenes egyenletét, amely segítségével ki tudtam számolni a minták kalciumtartamát mg/ml mennyiségben. Ezt követően normalizáltam a tényleges szív tömegre nézve (mg/ml/g).

Az ismertetett folyamatokat és méréseket 4 egércsoporton végeztem el, melyek a következők voltak:

- 3 hónapos nőstények
- 3 hónapos hímek
- 9 - 12 hónapos nőstények
- 9 - 12 hónapos hímek

A vizsgálatok által kapott képet komplexitásában, illetve különböző paraméterek szempontjából is elemeztem. Ezeket szeretném bemutatni, illetve részletezni az eredmények pontjában.

3.3.6. PPi mérés vérplazmából

A korábbiakban már tárgyalt vérvétel során levett ~1 ml vérmintákat jégen tároljuk. Majd centrifuga segítségével a vörösvérsejtek elválasztásra kerülnek. A centrifugázást 1000 g-n, 4 °C- on, 10 percig végeztem. Későbbiekben a felső frakciót (plazmát) összegyűjtöttem és 300 kD-s szűrőn (Satorius) centrifugálás során szétválasztottam az esetlegesen a plazmában maradt sejtes elemektől és vérlemezekétől. (Tiszta felülúszót szeretnénk ilyenkor kapni, ugyanis a sejtekből és vérlemezekéből további intracelluláris PPi szabadulhat fel, amely megzavarja az extracelluláris PPi-re vonatkozó mérésünket.) A centrifugálás ebben az esetben 2200 g-n, 4 °C- on, 30 percig zajlott. A filtrált vérplazmát -20°C -on tároltam PPi koncentráció meghatározásának időpontjáig.

A PPi mennyiségek meghatározását egy biolumineszcens vizsgálati módszerrel végeztem. Az előzetesen levett mintákat mérés előtt kiolvasztjuk. A kiolvadt minták pontos PPi tartalmának enzimátikus meghatározásához egy 96 lyukú plate-et használtam, azonban a szélső well-ek használata nélkül (korábbi méréseink alapján a plate szélein nem pontos a mérés). A Jansen és mtsi által publikált arányok felhasználásával számítottam ki, a 70 wellhez szükséges térfogatarányokat.

1.táblázat. 70 well-re jutó PPi assay-Mix kiszámítása

	Törzsoldat	Végleges koncentráció	1 mintához	70 mintához
MgCl ₂	1 mM	80 µM	6.4 µl	448 µl
ATPS	10 U/ml	32 mU/ml	0.256 µl	17.92 µl
APS	2 mM	16 µM	0.64 µl	44.8 µl
Hepes pH 7.4	0.5 M	50 mM	8 µl	560 µl
Minta			10 µl	10 µl
MQ víz			54.704 µl	3829.3 µl

Miután a falcon csőbe összemértem a mixet, multichanel pipettát alkalmazva kimértem a meghatározott 70 µl oldatot. Előző mérések tapasztalatai alapján a vizsgálatot úgy végeztem el, hogy a külső well-ekbe a mintáimmal megegyező térfogatú vizet mértem. Ennek oka az értékek közti szórás csökkentése volt. Így 60 db well került felhasználásra a 96 ból. Ezt követően 10-10 µl mintát szuszpendáltam, ezzel az össztérfogat 80 µl-re emelkedett. Célszerű

ezen folyamatokat jégen tartva elvégezni, az enzimreakciók minimalizálása végett. A mintákkal ellátott plate-re ezt követően egy átlátszó zárófólia kerül, a szennyeződések kizárása érdekében. Vortexelés után 300 g-n 30 másodpercig centrifugáltam. A PCR készülékben az oldathoz adott ATP szulfuriláz enzim (ATPs) adénózín 5' foszfoszulfát (APS) jelenlétében az oldatban lévő PPi-ből ATP-t állít elő. A mintákat 37 °C-on inkubáltam, 30 percen keresztül az enzim optimális működésének eléréséhez. 30 perc után a hőmérséklet 90 °C-ra emelkedik, melyen 10 percig üzemel, ekkor történik a ATPs enzim inaktiválása. Az ATP meghatározása a luciferáz reakciónak köszönhető, mely biolumineszcenciát vált ki. A Bactiter-Glo (BTG) (Promega, USA) egy fényérzékeny reagens, amely termotabil luciferáz enzim segítségével az ATP-vel arányos, lumineszcens jelet ad. A BTG kiolvasztása után multichannel pipettával 20 µl oldat pipettázása következett egy speciális fehér plate welljébe, melyhez 20 µl mintát adtam hozzá a mintákból. Az összemérést követően 300g-n 30 másodpercig centrifugáltam. 12 perc után, amelyet stopppal követtem a plate- et behelyeztem az EnSpire Multimode Plate Reader műszerbe és megmértem a minták lumineszcenciáját. Az értékek EnSpire program használatával váltak elérhetővé. Az adatokat Excelben dokumentáltam, majd kiértékeltem és a **6. fejezetben** foglaltam össze.

4. SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Kutás Adriána nyilatkozom, hogy a benyújtott **„Lágyszöveti meszesedés egér modelljének optimalizálása egy új lehetséges kezelési mód tesztelésének érdekében”** című dolgozatomban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

- A feldolgozásra szánt csalánt önállóan gyűjtöttem be, szárítottam ki, majd dolgoztam fel. Ezen kívül önállóan végeztem az extraktumokkal való vizsgálatokat és módszerek fejlesztését, valamint a kivenettel kapcsolatos eljárásokat.
- Önállóan végeztem a gélf formulációs eljárást és annak optimalizálását
- HPLC- MS mérések
- Az egerek farkán lévő jelölést én készítettem, súlyukat lemértem, majd dokumentáltam
- Az altatási folyamatokban részben vettem részt
- A szívfagyasztási műtétnél részben vettem részt, ugyanis magát a fagyasztást csak erre képzett operátor végezheti el, aki tudásáról és pszichológiai állapotáról rendszeresen vizsgát tesz. A varrási folyamatokat viszont én végeztem.
- A feltárási folyamatokat, a vérvételt, és a szívek eltávolítását saját kezűleg láttam el
- A kalciumméréshez szükséges eljárásokat magam végeztem, majd a spektrofotometriás mérést és az ehhez tartozó oldatok elkészítését is én láttam el
- PPI mérés vérplazmából
- Minden dokumentációs folyamat és a kiértékelések teljes mértékben hozzám köthetőek

5. MÉRT ÉS MEGHATÁROZOTT EREDMÉNYEK

5.1. Adatok ismertetése

Ebben a fejezetben az általam megvizsgált egyedek eredményeit szeretném ismertetni. A korábbiakban említett 4 csoportot (idős hím és nőstény egerek, fiatal hím és nőstény egerek) vizsgáltam.

A jegyzőkönyvben a következő adatok kerülnek dokumentálásra:

- az egerek ketrec száma + farkukon jelölt szám
- pontos születési dátum
- nem
- testsúly
- szívfagyasztás dátuma
- eltávolított szív súlya
- 550 nm-en mért abszorbancia értéke
- adott abszorbanciához tartozó kalcium érték
- szívre normalizált kalcium érték

- PPI szint a vérplazmából

Az eltávolított szívmintákon a meszesedés sok esetben szemmel is jól látható. Amennyiben jelentős eltérést tapasztalunk a meszesedés mértékében a várthoz képest, dokumentáljuk a jegyzőkönyvben. Ritkább esetekben előfordulhat, hogy az állat a műtétet követően a seben keresztül fertőzést kap, nem ébred fel az altatásból vagy egyéb indokból meghal. Ezt minden esetben fel kell tüntetni az általunk vezetett vizsgálati papírokon. (A mi kísérleteink során ilyen nem fordult elő)

2. táblázat 3 hónapos egerek adatai

Abcc6 ^{-/-} cryo		2023.07.03	2023.07.07								
Mice from Inst Enzymology											
cryo and colorimetry from hearts 5 days after cryo											
egér	Szül.idő	nem	súly (g)	cryo	Szív súlya (g)	Megj.	Abs (550) átlag	ug Ca (mg/ml)	Ca x 20 (mg/ml)	Súly normalizált Ca (mg/ml/g)	Vér PPI átlag (μM)
2741	2023.03.10	fm	22,6	2023.07.03	0,1108	-	0,1109	6,1	122,1	1101,63	-
2742	2023.03.10	fm	23,7	2023.07.03	0,0969	-	0,1406	7,6	152	1568,81	-
2743	2023.03.10	fm	22,6	2023.07.03	0,1103	kicsi folt	0,0945	5,28	105,5	956,66	0,45
2744	2023.03.10	fm	22,7	2023.07.03	0,1169	-	0,1096	6,04	120,7	1032,93	0,75
2745	2023.03.10	fm	23,9	2023.07.03	0,1419	-	0,2867	14,97	299,4	2109,78	-
2746	2023.03.10	fm	21,6	2023.07.03	0,0944	-	0,5623	28,87	577,4	6116,04	-
2747	2023.03.10	fm	20,7	2023.07.03	0,087	kicsi folt	0,1163	6,38	127,5	1465,61	0,85
egér	Szül.idő	nem	súly (g)	cryo	Szív súlya (g)	Megj.	Abs (550) átlag	ug Ca (mg/ml)	Ca x 20 (mg/ml)	Súly normalizált Ca (mg/ml/g)	Vér PPI átlag (μM)
2731	2023.03.15	m	32,84	2023.07.23	0,1628	-	0,4557	23,49	469,8	2885,96	0,23
2732	2023.03.15	m	37,42	2023.07.03	0,1416	-	0,6504	33,31	666,2	4704,9	0,46
2733	2023.03.15	m	35,59	2023.07.03	0,122	-	0,1546	8,31	166,1	1361,79	0,29
2734	2023.03.15	m	34,27	2023.07.03	0,1477	újraélesztés	0,621	31,83	636,6	4309,82	0,38
2735	2023.03.15	m	34,8	2023.07.03	0,1404	-	0,4726	24,34	486,9	3467,81	0,44
2736	2023.03.15	m	34,7	2023.07.03	0,1434	-	0,4777	24,6	492	3431,13	0,47

Az 2. táblázat a fiatal egerek adatait mutatja. A vizsgálatokhoz két ketrec állatait használtuk. Ez 7 db nőstény egeret és 6 db hímeket foglal magába. Jelentős különbség figyelhető meg a testsúlyok tekintetében. A nőstények jóval kisebb súllyal rendelkeznek. A nőstényeknél két egyednél, az eltávolított szív mintán csak minimális folt volt látható. A folt, a fagyasztás után fennmarad, tulajdonságaiból következtethetünk a meszesedés mértékére. A hímeknél nem találtunk ilyen mintát, viszont ebben a csoportban egy állatot újra kellett éleszteni. Néhány esetben az állatok túl sokkos állapotba kerülnek a szív fagyasztását követően, ekkor a légzés összeomlik, a szív megszűnik dobogni. Amint ezt észleljük megkezdjük az újraélesztés folyamatát, amit egy ujjal végzünk a szegycsonton. Ritmikus nyomásokat merünk a mellkasra, nagyon ritka az az eset amikor az újraélesztés után az állat ismételten összeomlik, vagy nem sikerül a művelet. Az abszorbanancia mérést követően a standardek egyenesének egyenletéből számítjuk a pontos kalcium mennyiségét. Ennek számítását a fiatal egerek csoportjánál ismertetem a későbbiekben.

3. táblázat 9 -12 hónapos egerek adatai

Abcc6 ^{-/-} -cryo		2023.06.22	2023.06.26								
Mice from Inst Enzym ology											
cryo and colorimetry from hearts 5 days after cryo											
egér	Születő	nem	súly (g)	cryo	Szív súlya (g)	Megj.	Abs (550) átlag	ug Ca (mg/ml)	Ca x 20 (mg/ml)	Súly normalizált Ca (mg/ml/g)	Vér PPI átlag (μM)
1711	2022.09.12	m	43	2023.06.22	0,16	kicsi folt	0,84	45,43	908,60	5696,5	-
1712	2022.09.12	m	39,6	2023.06.22	0,13	kicsi folt	0,08	4,31	86,1	662,80	-
1713	2022.09.12	m	38,6	2023.06.22	0,15	-	0,17	9,48	189,60	1232,50	0,34
1714	2022.09.12	m	41,5	2023.06.22	0,13	-	0,60	32,14	642,90	4830,00	0,31
Abcc6 ^{-/-} -cryo		2023.06.23	2023.06.27								
egér	Születő	nem	súly (g)	cryo	Szív súlya (g)	Megj.	Abs (550) átlag	ug Ca (mg/ml)	Ca x 20 (mg/ml)	Súly normalizált Ca (mg/ml/g)	Vér PPI átlag (μM)
1921	2022.10.09	fm	20,18	2023.06.23	0,09	-	0,95	51,18	1023,60	10889,80	0,53
1922	2022.10.09	fm	20,3	2023.06.23	0,09	kicsi folt	0,07	4,01	80,2	905,20	0,73
1923	2022.10.09	fm	22,6	2023.06.23	0,11	nagy folt	0,45	24,20	484,00	4388,40	-
egér	Születő	nem	súly (g)	cryo	Szív súlya (g)	Megj.	Abs (550) átlag	ug Ca (mg/ml)	Ca x 20 (mg/ml)	Súly normalizált Ca (mg/ml/g)	Vér PPI átlag (μM)
1561	2022.06.15	fm	31,8	2023.06.23	0,11	-	1,09	58,80	1175,90	10333,30	1,02
1562	2022.06.15	fm	27,3	2023.06.23	0,11	-	0,86	46,29	925,90	8784,40	0,54
1563	2022.06.15	fm	27,7	2023.06.23	0,11	kicsi folt	0,25	13,41	268,10	2548,60	0,96
egér	Születő	nem	súly (g)	cryo	Szív súlya (g)	Megj.	Abs (550) átlag	ug Ca (mg/ml)	Ca x 20 (mg/ml)	Súly normalizált Ca (mg/ml/g)	Vér PPI átlag (μM)
1421	2022.08.24	m	32,7	2023.06.23	0,12	-	0,03	1,79	35,90	289,80	0,36
1422	2022.08.24	m	29,8	2023.06.23	0,12	-	0,05	2,70	53,90	444,40	0,38

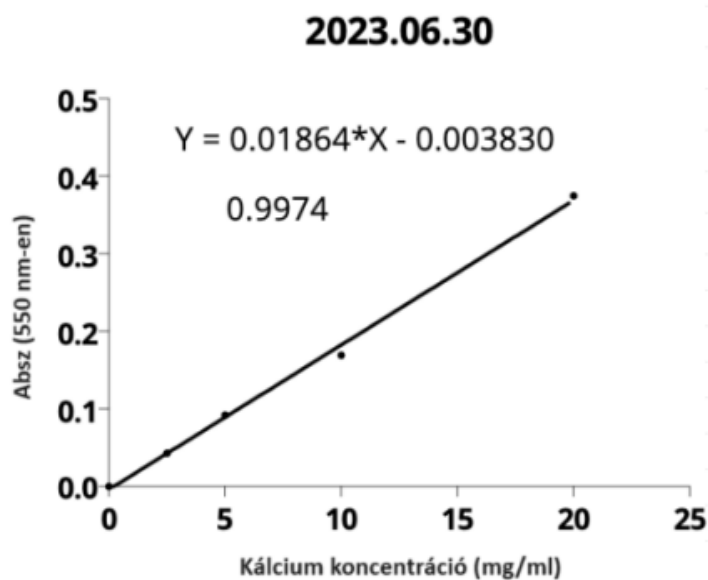
Az idős egereknél 4 ketrec tette ki a vizsgált állatok számát. Ebben az esetben 6 nőstény és 5db hím egeret alkalmaztunk. A 171- es ketrecben a hímek kifejezetten nagy súllyal rendelkeztek. A többi ketreceknél ez az érték egymáshoz közeli volt.

5.2. Mérésekhez tartozó számítások

Az fiatal egerek esetében szeretném levezetni a kalciummérés meghatározásának lépéseit. A mérés során a korábbiakban említett módon a mintákon kívül 5 kalibráló oldatot készítettem. A spektrofotometriás mérés során a vakkal kezdtem, majd 0- ra állítottam. Ezt követően lemértem a kalibrációs sor további tagjait, célszerű két mérést végezni, az értékek pontossága miatt. Az utolsó tag után átmostam a küvettát a vakkal. A mintákat a lila szín intenzitása növekedésének sorrendjében mértem, annak érdekében, hogy a minták ne zavarják a másik minta értékét. Szintén végeztem párhuzamos mérést. A mért értékeket lementettem, majd Prism6 segítségével kiértékelést végeztem. Felvettem a standardek abszorbancia értékeit és ábrázoltam őket. A pontokra trendvonalat illesztettem, kiírva az egyenletet és R^2 értékét.

4. táblázat Kalibrációs sor adatai

standard	
Ca (mg/ml)	Abs (550 nm) átlag
0	0
2,5	0,0433
5	0,0923
10	0,1695
20	0,3746



12. ábra Kalibrációs egyenes

A táblázat szerinti 2741-es egér adatain keresztül szeretném levezetni a kalcium mérés kiértékelését. Ezen egyed szövetmintájának oldatára az abszorbancia 550 nm-en 0,11. A ábra kalibrációs egyenes megadta a számomra szükséges egyenletet. Y tengely értékei az abszorbancia adatai, így első lépésben szükséges az egyenletet X ismeretlenre rendezni.

A rendezett egyenlet:

$$X = \frac{Y + 0,00383}{0,01864} \left[\frac{mg}{ml} \right]$$

A 2741-es egyed adataival behelyettesítve:

$$X = \frac{0,11 + 0,00383}{0,01864} \left[\frac{mg}{ml} \right]$$

$$X = 6,1 \left[\frac{mg}{ml} \right]$$

X értéke a szövetminták oldatának méréshez felhasznált térfogatában (10 ul) lévő pontos kalcium tartalmat jelöli. Ezt az értéket a számítás után 20-szal szorozzuk, ugyanis a mintáink teljes kiindulási térfogata 200 ul.

Jelen esetben:

$$20X = 20Ca \left[\frac{mg}{ml} \right]$$

$$20 * 6,1 = 20Ca_{2741} \left[\frac{mg}{ml} \right]$$

$$20Ca_{2741} = 122 \left[\frac{mg}{ml} \right]$$

Megállapítható, hogy a 2741-es egér szívizom szövetében 122 mg/ml kalcium volt jelen. Az így kapott adatot szükséges még normalizálnunk a szív mért súlyára. Ez annyit tesz, hogy a számított értéket elosztjuk a mért értékkel.

$$Ca_{norm} = \frac{20Ca}{m_{szív}} \left[\frac{\frac{mg}{ml}}{g} \right]$$

$$Ca_{norm2741} = \frac{122}{0,1108} \left[\frac{\frac{mg}{ml}}{g} \right]$$

$$Ca_{norm2741} = 1101,63 \left[\frac{\frac{mg}{ml}}{g} \right]$$

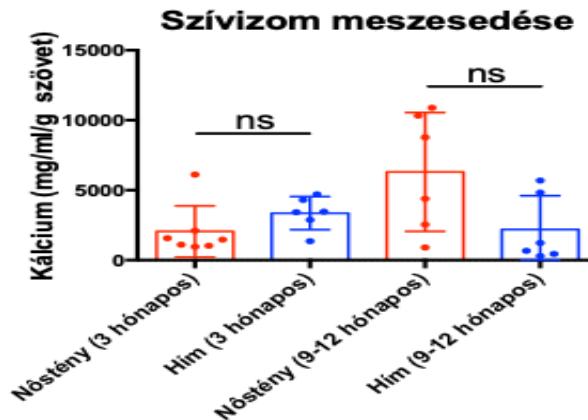
Tehát a 2741- es egér esetében a szívre normalizált össz kalciumtartalom 1101,63 [mg/ml/g].

6. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

6.1. Meszesedés mértéke a lágyszövetben

A **13. ábrán** a komplex mérés látható, minden csoport külön- külön került feltüntetésre. Az egyes csoportok adatai kerültek x tengelyen feltüntetésre, míg y tengelyen a számolt kalcium érték szívre normalizált értéke.

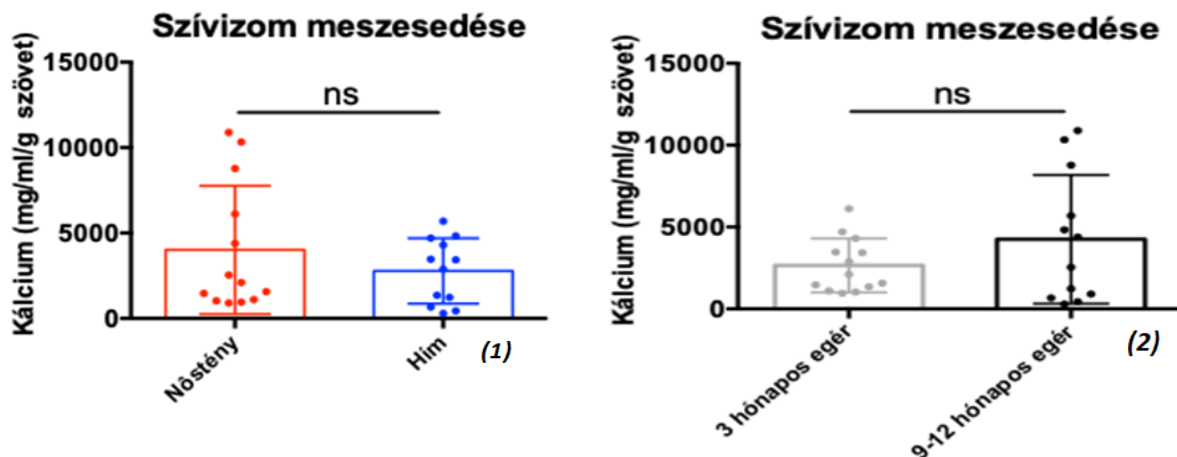
13. ábra A szívizom meszesedésének mértéke fagyasztással indukált sérülés után a négy



különböző korú és nemű csoportban

A **13. ábra** jól szemlélteti, hogy nemre és korra lebontva a vizsgált csoportok nem mutatnak szignifikáns eltérést a szív meszesedésében. Azonban minden csoportban nagy egyedi különbségek figyelhetők meg.

A következő esetekben felbontottam 2 csoportra méréseimet.



14. ábra

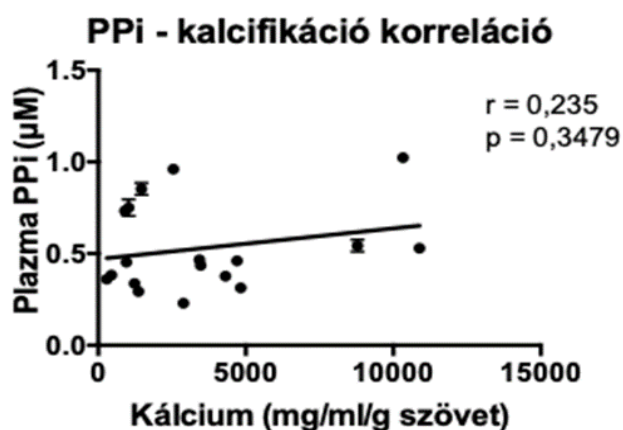
(1) A szívizom meszesedésének mértéke fagyasztással indukált sérülés után nemekre bontva

(2) A szívizom meszesedésének mértéke fagyasztással indukált sérülés után az életkor szempontját tekintve

A **14. (1) ábrán** a szórás jelentős az egyedek közt. A fiatal csoportnál kisebb szórás figyelhető meg. Viszont a legalacsonyabb minta értéke is magasabban helyezkedik el, mint az idős egyedek összetartóbb értékei. Életkor szempontjából sem állapítható meg összefüggés a meszesedéssel párhuzamba vonva.

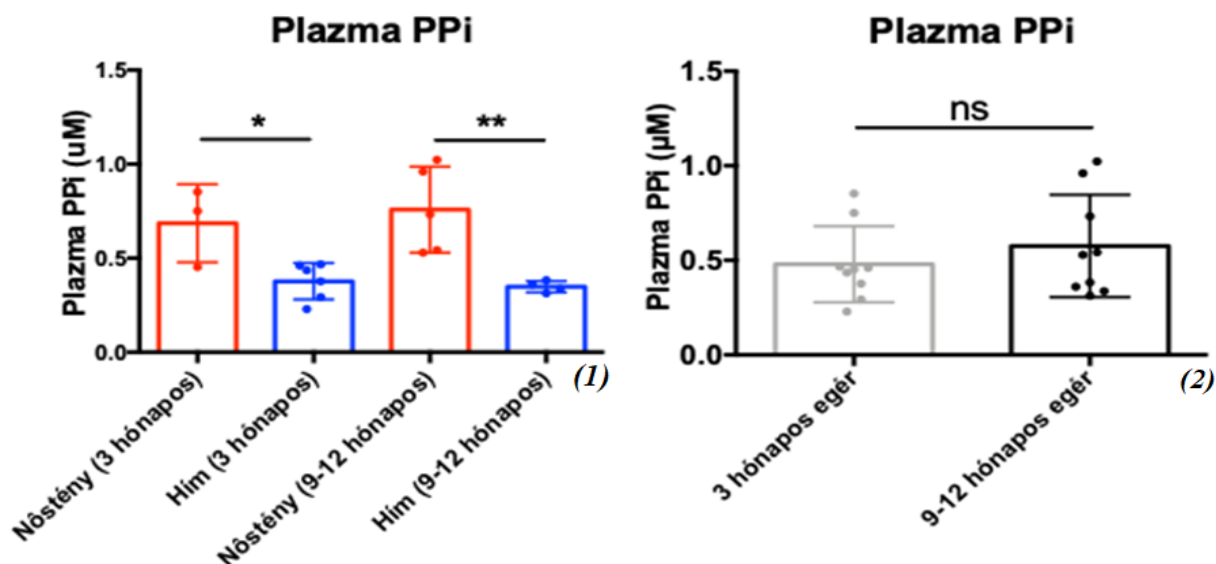
Amennyiben az összehasonlítást csak nemre nézzük a **14. (2) ábrán**, szintén nem szignifikáns a különbség. A nőstény egyedek tekintetében 2 magasan kiugró értéket figyelhetünk meg. A hímek mérsékeltebb szórást mutatnak.

6.2. PPI mérés eredmények



15. ábra Kalcifikáció a plazma PPI függvényében

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a meszesedés mögött milyen pirofoszfát szintek mutatkoznak az egerek szervezetében, és hogy ez milyen hatással lehet a méréseinkre. Azt feltételeztük, hogy a szórás mértéke a különböző pirofoszfát szintek közötti eltérésekből adódik. A mérési eredmények azonban nem mutatnak korrelációt a plazma PPI szint és a meszesedés mértéke között, nem nyújtanak magyarázatot a meszesedési értékek magas szórására.



16. ábra.

(1): Plazma pirofoszfát szint a 4 különböző korú és nemű csoportban.

(2): Plazma pirofoszfát szint életkor szempontját tekintve.

Az **16.(1) ábra** kiválóan szemlélteti, hogy a nőstény egerek szervezetében szignifikánsan magasabb a pirofoszfát szint, mint a hím egyedeknél. Ez az adat vizuálisan érzékelteti a nemek közötti jelentős kémiai eltéréseket, amelyek kihatással vannak az egerek biokémiai profiljára. A kutatócsoport a jövőben mindenképpen részletesen vizsgálni fogja ezt a jelenséget. Az **16.(2) ábra** rávilágít arra, hogy életkor szempontjából nem figyelhető meg számottevő különbség a vizsgált egerek között. Ez azt jelzi, hogy a kor nem játszik meghatározó szerepet az általunk vizsgált paraméterek változatosságában.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatási témámban több cél is megfogalmazódott. A dolgozatom egyik célja az általam készített növényi extraktumok és kivonatok elemzése és formulációja, majd a kapcsolatos eredmények és tervek bemutatása, különös hangsúlyt fektetve a koncentrációval kapcsolatos kihívásokra és azok lehetséges megoldásaira. Az általam előállított növényi extraktumok esetében megfigyeltem, hogy a koncentrációjuk kevésbé bizonyultak alkalmasnak a tervezett célokhoz. Ez további kísérletek tervezését inspirálta és az alkoholban oldott gyógynövény kivonatok irányába indultam. A módszerek sikeres eredményeket mutattak a gélformulációs eljárások során.

Kutatásom középpontjában elsősorban a kapcsolódó állatkísérletek eredményeinek részletes elemzése áll, különös tekintettel az érintett egércsoport nemére és életkorára. Az adatok elemzése során azt állapítottam meg, hogy a légyszöveti meszesedés mértékében a felsorolt paraméterek közötti kapcsolatok nem mutatnak szignifikáns összefüggést. Ez a munka számára hasznos és előnyös információ.

Az egyes állatok kalcifikáció mértéke alapján megfigyelhető, hogy az eredmények nagy szórást mutatnak. Többféle tényező befolyásolhatja ezen értékeket. Az állatkísérletek nagyon összetett folyamatok. Az ektópikus meszesedés egyik kiváltó tényezője a pirofoszfát szint csökkenése. Ez az egerek szervezetében is megtalálható jelenség. Ezen kívül a szív fagyasztás hatékonysága is nagy szerepet játszhat a meszesedés mértékében.

Bár nem találtunk szignifikáns különbséget a különböző korú és nemű csoportok között, észrevettük, hogy a kalcifikációs értékek szórása alacsonyabb volt a hímek között. Emellett megfigyeltük, hogy a hímek plazma pirofoszfát (PPi) szintje is alacsonyabb, és bár a mi méréseinknél nem mutatott korrelációt a meszesedéssel, az irodalmi adatok szerint erősebb meszesedést okozhat. Ennek fényében talán érdemes lenne a szív fagyasztásos kísérleteket hím egerekkel végezni. Ez az információ a légyszöveti meszesedéssel foglalkozó kutatócsoport számára is hasznosnak bizonyul, ugyanis azonos eljárást alkalmaznak, mint amelyet én is tervezek a későbbiekben.

A későbbi kísérleteim fókuszja a csalán hatóanyag hatékonyságára tervezett állatkísérlet lesz, melyeket a korábban ismertetett módszerek alapján fogok megvalósítani. Az állatkísérletek segítenek megérteni a gyógynövény kivonatok biológiai hatásait, valamint az alkoholban oldott kivonatok potenciális előnyeit és kockázatait az élő szervezetekben.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni hálás köszönetem külső témavezetőmnek, Pomozi Violának, aki végtelen kedvességével, segítőkészségével és kiváló szakértelmével mindvégig mellettem állt. Nagyra értékelem azt a türelmet, amellyel válaszolt minden kérdésemre, amellet, hogy mindig számíthattam rá, bármilyen helyzetben. A rendszeres konzultációink során elkötelezetten foglalkozott velem, hasznos tanácsokkal látott el, és időt nem kímélve segítette az előrehaladásomat. Betekintést kaptam, olyan területekre, amelyekről korábban csak álmodoztam. Hálás vagyok neki, az elsajátított módszerekért és eljárásokért.

Külön köszönettel tartozom belső témavezetőmnek, Mucsi Zoltánnak, aki hosszú konzultációkon keresztül mindig támogatott és motivált a céljaim elérésében. Nagyra becsülöm a szakmai tudását, illetve mindazt, amit tőle tanulhattam. Az ő tanórái ébresztették fel az érdeklődésemet ezen szakterület irányába, amelyen most lelkesen és teljes odaadással tevékenykedem.

Hálával tartozom mindkét témavezetőmnek, hogy mindig figyelemmel fogadták az ötleteimet, és a konstruktív visszajelzéseikkel segítettek javítani a kutatásom minőségét. Hálás vagyok nekik, hogy nemcsak mint témavezető, hanem mint mentor is irányítottak és ösztönöztek.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] K.H. Neldner. (1988. Jan-Ma 6). Pseudoxantoma Elasticum. *Clin Dermatol*, (1):1-159. doi:10.1111/j.1365-4362.1988.tb01280.x.
- [2] Autoszomális recesszív öröklés. Wikipédia.
Forrás:https://hu.wikipedia/wiki/Transmission_autosomique_r%C3%A9cessive
- [3] Le Saux O, Urban Z, Tschuch C, Csiszar K, Bacchelli B, Quaglino D, Pasquali-Ronchetti I, Pope FM, Richards A, Terry S, Bercovitch L, de Paepe A, Boyd CD. Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 2000;25:223-227. Neldner KH. Pseudoxantoma Elasticum. *Clin Dermatol*, 1988;(1):1-159.
- [4] Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, Terry S, Breuning M, Dauwerse H, Swart J, Kool M, van Soest S, Baas F, ten Brink JB, de Jong PT. Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 2000;25:228-231.
- [5] Alison M Boyce , Rachel I Gafni , & Carlos R Ferre. (2020 . Jun). Generalized Arterial Calcification of Infancy: New Insights, Controversies, and Approach to Management. *Curr Osteoporos Rep*, (11):232-241. doi:10.1007/s11914-020-00577-4
- [6] Aherrahrou Z, Doebling LC, Ehlers EM, Liptau H, Depping R, Insel-Nitschke P, . . . Schunkert H. An alternative splice variant in Abcc6, the gene causing dystrophic calcification, leads to protein deficiency in C3H/He mice. *J Biol Chem*, 2008;283:7608-7615.
- [7] Dedinszki D, Szeri F, Kozák E, Pomozi V, Tókési N, Mezei TR, Merczel K, Letavernier E, Tang E, Le Saux O, Arányi T, van de Wetering K, Váradi A. Oral administration of pyrophosphate inhibits connective tissue calcification. *EMBO Mol Med*. 2017;9(11):1463-1470.
- [8] Hoffmann, D. (2003). *MEDICAL HERBALISM :The Science and Practice of Herbal Medicine*. Rochester, Vermont.
- [9] Testai Lara , Chericoni Silvio, Calderone Vincenzo , Nencioni Giulia, Nieri Paola , Morelli Ivano , & Martinotti Enrica. (2002). Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. In *Journal of Ethnopharmacology*. Pisa, Italy. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00055-7)
- [10] Tahri Abdelhafid, Yamani Sabah, Legssy Abdelkhaleq, Aziz Mohammed, Mekhfi Hassane, Bnouham Mohammed, & Ziyat Abderrahim. (2000). Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. In *Journal of Ethnopharmacology* (old.: 95-100). Laboratoire de Physiologie et Pharmacologie Cellulaire, Morocco. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00270-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00270-1)
- [11] Kanter M., Meral I., Dede S. , Cemek M., Ozbek H., Uygun I., & Gunduz H.. (2003). Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzyme Systems and Some Liver Enzymes in CCl4-Treated Rats. In *Transboundary and Emerging Diseases* (old.: 264-268). Yuzuncu Yil Universitesi, Turkey. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2003.00537.x>
- [12] Wagner H. , Willer F., Samtleben R., & Boos G. (1994). Search for the antiprostatic principle of stinging nettle (*Urtica dioica*) roots. In *Phytomedicine* (old.: 213-224). Institute of Pharmaceutical Biology, University of Munich. doi:[https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(11\)80068-1](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(11)80068-1).