

DEBRECENI EGYETEM
HANKÓCZY JENŐ DOKTORI ISKOLA

Doktori iskola vezető:

Prof. Dr. Kátai János
egyetemi tanár, CSc

Témavezetők:

Dr. Máthé Endre
egyetemi docens, PhD

Dr. Kovács Béla
egyetemi tanár, PhD

**AZ ARTICSÓKA (*CYNARA SCOLYMUS* L.) ÉS A GÖRÖGSZÉNA
(*TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM* L.) EXTRAKTUMOK KÉMIAI
TÉRKÉPEZÉSE ÉS ÉLETTANI HATÁSAIK VIZSGÁLATA *IN VITRO* ÉS *IN*
VIVO MODELL RENDSZEREKEN**

Készítette:

Vigh Szabolcs
doktorjelölt

Debrecen
2017

**AZ ARTICSÓKA (*CYNARA SCOLYMUS L.*) ÉS A GÖRÖGSZÉNA
(*TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM L.*) EXTRAKTUMOK KÉMIAI
TÉRKÉPEZÉSE ÉS ÉLETTANI HATÁSAIK VIZSGÁLATA *IN VITRO* ÉS *IN*
VIVO MODELL RENDSZEREKEN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében az élelmiszertudományágban

Írta: Vigh Szabolcs okleveles élelmiszer-minőségbiztosító agrármérnök

Készült a Debreceni Egyetem Hankóczy Jenő Doktori Iskola élelmiszeranalitika,
élelmiszerbiztonság doktori programja keretében

Témavezető: Dr. Máthé Endre, egyetemi docens és Dr. Kovács Béla, egyetemi tanár

A doktori szigorlati bizottság:

	név	fokozat
Elnök:	Dr. Sipos Péter	PhD
Tagok:	Dr. Prokisch József	PhD
	Dr. Szakál Pál	CSc

A doktori szigorlat időpontja: 2016. szeptember.02.

Az értekezés bírálói:

név	fokozat	aláírás
Dr. Borbély György	DSc
Pályiné Dr. Krekk Zsuzsanna	PhD

A bírálóbizottság:

	név	fokozat	aláírás
elnök:		
tagok:		
		
		
titkár:		

Az értekezés védésének időpontja: 2017.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3
2.1. Az articsóka (<i>Cynara scolymus</i> L.) botanikája és farmakológiája.....	3
2.2. A görögszéna (<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.) botanikája és farmakológiája.....	6
2.3. A növényi eredetű bioaktív hatóanyagok.....	12
2.3.1. Az aminosavak.....	12
2.3.2. A purinok és a pirimidinek.....	14
2.3.3. Az alkaloidok.....	14
2.3.4. A polifenolok.....	15
2.3.4.1. A flavonoidok.....	15
2.3.4.2. A kumarinok.....	17
2.3.5. A szaponinok.....	18
2.3.6. A szteroidok.....	18
2.3.7. A terpenoidok.....	19
2.3.8. A vitaminok.....	19
2.4. A növényi eredetű extraktumok interdiszciplináris jellemzése.....	20
2.4.1. A növényi extraktumok bioaktív hatóanyagainak analitikai kémiai vizsgálata.....	21
2.4.2. A növényi extraktumok genotoxikus hatásának vizsgálata <i>Drosophila melanogaster</i> -en.....	24
2.4.3. A növényi extraktumok citotoxicitásának elemzése humán sejtvonalakon.....	34
2.4.3.1. Az MTT citotoxicitási teszt.....	34
2.4.3.2. Az immunhisztokémia.....	35
2.5. A növényi eredetű bioaktív hatóanyagok alkalmazási lehetőségei az emlőrák prevenciója/terápiája során.....	36
2.6. Szakmai motiváció.....	39
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	41

4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	42
4.1. A növényi extraktumok készítése.....	42
4.2. A növényi extraktumok UHPLC-ESI-MS vizsgálata.....	42
4.3. A növényi extraktumok spektrofotometriai vizsgálata.....	43
4.3.1. Az összpolicifol-tartalom meghatározás.....	43
4.3.2. Az összflavonoid-tartalom meghatározás.....	44
4.3.3. Az összzantocián-tartalom meghatározás.....	44
4.3.4. Az antioxidáns kapacitás meghatározás.....	45
4.4. A <i>Drosophila melanogaster</i> specifikus vizsgálati módszerek.....	45
4.4.1. A <i>Drosophila melanogaster</i> tenyésztése.....	45
4.4.2. A <i>Drosophila melanogaster</i> életképességi vizsgálatok.....	46
4.4.3. A SMART módszer.....	46
4.5. A humán sejtvonalak tenyésztése és vizsgálata.....	47
4.5.1. Az alkalmazott humán emlőrák sejtvonalak.....	47
4.5.2. A sejttenyésztési körülmények.....	48
4.5.3. Az MTT viabilitás/proliferációs teszt.....	48
4.5.4. Az immunfestés.....	49
4.6. Adatfeldolgozás és kiértékelés.....	51
5. EREDMÉNYEK.....	52
5.1. Az articsóka extraktumok bioaktív hatóanyag-tartalmának UHPLC-ESI-MS jellemzése.....	52
5.2. A görögszéna extraktumok bioaktív hatóanyag-tartalmának UHPLC-ESI-MS jellemzése.....	60
5.3. Az articsóka és a görögszéna extraktumok bioaktív hatóanyag-tartalmának és <i>in vitro</i> antioxidáns paramétereinek összehasonlító jellemzése.....	67
5.4. Az articsóka és a görögszéna extraktumok hatásainak <i>in vivo</i> tesztelése <i>Drosophila melanogaster</i> -en.....	71
5.4.1. Az articsóka és a görögszéna extraktumok hatása az <i>ecetmuslica</i> életképességére.....	71
5.4.2. Az articsóka és a görögszéna extraktumok genotoxikus hatásának vizsgálata SMART tesztrendszerrel.....	74

5.5. Az articsóka és a görögszéna extraktumok hatásainak <i>in vitro</i> tesztelése humán emlőkarcinóma sejtvonalakon.....	76
5.5.1. A vizes articsóka extraktum sejtvonalak életképességére gyakorolt hatása.....	77
5.5.2. A vizes görögszéna extraktum sejtvonalak életképességére gyakorolt hatása.....	81
5.5.3. Az alkoholos articsóka extraktum sejtvonalak életképességére gyakorolt hatása.....	85
5.5.4. Az alkoholos görögszéna extraktum sejtvonalak életképességére gyakorolt hatása.....	89
6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK.....	96
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	104
8. GYAKORLATBAN ALKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK.....	106
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	107
9. SUMMARY.....	108
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	109
11. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN.....	135
12. MELLÉKLETEK.....	138

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

4-HIL – 4-Hidroxi-izoleucin

DAPI – 4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidroklorid, DNS-hez kötődő fluoreszcens festék

DMSO – dimetil-szulfoxid

DNPBMC – N,N-dinitrozo-2,6-bis-hidroximetil-piridin-bismetilkarbamát

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

EMS – etil-metán-szulfonát

FBS – Fetal Bovine Serum (magzati borjú szérum)

FCS – Fetal Calf Serum (magzati borjú szérum)

flr – *flair* (*Drosophila melanogaster* mutáns)

GLUT4 – négyes típusú glükóz transzporter

HPLC-MS – High-performance liquid chromatography-mass spectrometry,
Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia - tömegspektrometria

L1,2,3 – lárvaállapot

MTT – 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólium bromid

mwh – *multiple wing hair* (*Drosophila melanogaster* mutáns)

PLK – Polo-like kináz

SMART – Somatic Mutation And Recombination Test, Szomatikus mutáció és rekombináció teszt

T-47D – humán emlőkarcinóma sejtvonat

TM2 – transzmembrán domén, balanszer koromoszóma

Ubx – Ultrabithorax gén

ZR-75-1 – humán emlőkarcinóma sejtvonat

1. BEVEZETÉS

A 21. századi népbetegségek arányának emelkedése a gyógyszeripar folyamatos fejlődése ellenére bebizonyította, hogy az ősidők óta környezetünkben fellelhető gyógynövényekre, a növények gyógyító tulajdonságainak alkalmazására továbbra is szükség van. Ezeket a jótékony hatással rendelkező növényeket a gyógyszeripar is felhasználja, ugyanakkor egyre nagyobb számban jelentek meg olyan táplálék-kiegészítők és különböző komplementer terápiás készítmények, amelyekről sok esetben kiderül, hogy hatásmechanizmusuk nem bizonyított sem egyed (klinikai tesztek), sem celluláris/molekuláris szinteken. Az a tény, hogy az egyes táplálék-kiegészítők és komplementer terápiás készítmények mégis forgalomba hozhatóak, azzal magyarázható, hogy nem toxikusak, csak hogy, az esetek többségében nem ismertek a dóziszfüggő hatások sem, és akkor nem is említettük a fogyasztók egyedi genomjával és egyéni egészségi állapotával összefüggő válaszreakcióit. A növényi eredetű bioaktív hatóanyagok (drogok) a hatásmechanizmusuk ismerete nélküli krónikus betegségek kezelésére történő alkalmazása egészségre káros hatásokat is eredményezhet. E megfontolások alapján kijelenthető, hogy a növényi eredetű bioaktív hatóanyagok jövőbeli preventív és/vagy terápiás alkalmazásait nagy körültekintéssel kell végezni, és az is nyilvánvaló, hogy a posztgenomiális érában, erre a célra a rendszerbiológiai megközelítés látszik a legalkalmasabbnak.

Számos epidemiológiai tanulmány rámutat arra a tényre, hogy a civilizált életmóddal kapcsolatos különféle hatásoknak köszönhetően megnövekedett a krónikus betegségek okozta elhalálozások száma is. Magyarország egészségügyi állapota európai viszonylatban az egyik legkedvezőtlenebb helyzetben van, míg a világ országai között a középmezőnyben foglal helyet (Tompai, 2011; WHO). Az eltérő korosztályoknál és nemeknél kialakult betegségek gyakorisága mellett elmondható általánosságban, hogy az összes halálozások számát figyelembe véve a leggyakrabban előforduló halálokok között a szív- és érrendszeri betegségek (54%), a daganatos betegségek (27%), az emésztőszervi betegségek (8%) és a légzőszervi betegségek (4%) szerepelnek. Bizonyított tény, hogy a szív és érrendszeri betegségek terápiája hatékonynak mutatkozik, és prevenciója terén is vannak sikerek. A rákos megbetegedések terápiájának hatékonysága folyamatosan növekszik, azonban prevenciója még nem jelentős hatású, ami azzal is magyarázható, hogy a genetikai hajlammal kapcsolatos szűrővizsgálatok és a korai diagnosztika lehetőségei korlátozottak. Magyarországon 2013-ban – mint az a Nemzeti

Egészségfejlesztési Intézet legfrissebb jelentéséből kiderül – a bejelentetett összes elhalálozás (126.778 fő) közül 33.274 haláleset vezethető vissza daganatos megbetegedésre. Mindkét nem esetében a tüdő-, valamint a vastag-és végbél daganatok állnak az első két helyen, míg a harmadik leggyakrabban daganattípus a férfiaknál a prosztatata-, nőknél pedig az emlődaganat.

Ezen betegségek okai összetettek, az öröklött, illetve a szomatikus sejtekben újonnan megjelenő hajlamosító mutációkon túl a környezeti tényezők is szerepet játszanak a kialakulásukban úgy, mint a nem megfelelő életmód (helytelen táplálkozás, kevés mozgás, erőteljes stressz). Ugyanakkor számos kísérleti bizonyíték azt látszik megerősíteni, hogy a környezeti tényezők oldalán beavatkozva, sikereket lehet elérni az elhalálozási statisztikákat vezető szív- és érrendszeri, illetve a rákos betegségek prevenciója és terápiája terén. Valójában nem is marad más terápiás lehetőség, mint a környezeti tényezők oldalán történő beavatkozás, hiszen a hajlamosító mutációk sejt-specifikus génterápiás kijavítása egyelőre kevésbé hatékony. Így aztán érthető, hogy a táplálékkal bevitt növényi eredetű bioaktív hatóanyagok egyre inkább felértékelődnek a szív- és érrendszeri, illetve a rákos betegségek prevenciója és terápiája kapcsán (Dietz *et al.*, 2016). Ezeknek a molekuláknak a megismerése, jellemzése világszerte a tudományos érdeklődés fókuszában áll (American Cancer Society, 2016). Ezt látszik alátámasztani To Youyou 2015-ös Orvosi Nobel-díja is, hiszen az *Artemisia annua* (egynyári üröm) növényből kinyert artemisinin nevű bioaktív hatóanyaggal sikeresen lehetett gyógyítani a maláriát.

A doktori munkámban szereplő vizsgálatokat a fenti szemlélet alapján terveztem és végeztem el. Az articsóka (*Cynara scolymus* L.) és görögszéna (*Trigonella foenum-graecum* L.) alapú növényi extraktumok előállítására és kémiai összetételének meghatározására törekedtem, majd a beazonosított bioaktív komponensek alapján vizsgáltam az extraktumok potenciális citotoxikus és genotoxikus hatásait. Az eredmények alapján kijelenthető, hogy az articsóka és görögszéna extraktumok képesek csökkenteni az emlőtumoros sejtek életképességét és nem rendelkeznek genotoxikus hatással. Ezek pedig mintegy előrevetítik az articsóka és görögszéna extraktumok alkalmazási lehetőségeit a rákos megbetegedések prevenciója és/vagy terápiája során.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az articsóka (*Cynara scolymus* L.) botanikája és farmakológiája

Az articsóka (*Cynara scolymus* L.) a fészkesek családjába (*Asteraceae*) tartozó lágyszárú, évelő növény (1. ábra). Az erőteljes gyökérzete akár 2-3 méter mélységig is képes lehatolni. Alapi rügyeiből sarjakat fejleszt, ezáltal évente megújul, viszont 4-5 év után a középső töve elpusztul. A 1,5-2 m magas, elágazó szárán a levelek tölevélrózsát alkotnak. Gazdasági értelemben vett termése a virágzati kezdemény, mely a főszár melletti elágazásokon is megjelenik. A csöves virágokból felépülő fészkes virágzatát, több sorban, a virágzatra boruló, húsos pikkelylevelek jellemzik. A csöves virágok, összenőtt szíromlevelei kék vagy lila színben pompáznak. Hazánkba Olaszországból került be a növény a XV-XVI. században, melyet a viszonylag bonyolult termesztéstechnológiája miatt elsősorban a főúri kertészetekben termesztettek a XX. század elejéig, majd a későbbiekben a növény termesztése teljesen háttérbe szorult (Ombódi és Pestiné, 2011). A gyógyászatban elsősorban az articsóka leveleit használják a biológiailag aktív komponensei miatt (Bencsik, 2011).



1. ábra: Articsóka (Internet1)

Napjainkban az articsóka (*Cynara scolymus* L.) ígéretes orvosi növényként van jelen a köztudatban, mivel kivonatai sok hasznos bioaktív komponenst tartalmaznak, melyek hatásait *in vitro* kísérletek és klinikai vizsgálatok során tanulmányozták (Ben Salem *et al.*, 2015). A növény egészségtámogató tulajdonságai között azonosították és

alaposan elemzték az antioxidáns, a szív- és érrendszeri, a májvédő, a koleretikus (epetermelést segítő/epehajtó), a posztprandiális vércukorszint csökkentő, a koleszterinszint csökkentő illetve trigliceridszint csökkentő, valamint a prebiotikus hatásait.

Számos antioxidáns tulajdonsággal rendelkező bioaktív összetevőt azonosítottak articsókában és igazolták antioxidáns aktivitásukat számos preklinikai vizsgálatban (Betancor-Fernandez *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Llorach, 2002; Fintelmann, 1996a; Adzet *et al.*, 1987). További tanulmányok felvetettek egy antioxidáns alapú májvédő hatást, amelyet patkány májsejteken tenyésztett endoteliális sejteken (Gebhardt és Fausel, 1997; Gebhardt, 1995; Adzet *et al.*, 1987), monocitákon (Zapolska-Downar *et al.*, 2002) és *in vivo* patkány modellrendszeren igazoltak (Magielse *et al.*, 2014; Jimenez-Escrig *et al.*, 2003). Az articsóka májvédő hatását a polifenol tartalmával is összefüggésbe hozták, ami ezáltal ellensúlyozza a lipidperoxidációt a patkány májsejtjeinek membránstruktúráiban (Gebhardt, 1995), és elősegíti az epetermelés által asszisztált zsírbontást (Kraft, 1997), beleértve a toxinok eltávolítását is (Fintelmann, 1996b). Az articsóka antioxidáns tulajdonságú vegyületeiről azt is feltételezték továbbá, hogy gátolja az LDL (low-density lipoproteinek) oxidációját (Brown és Rice-Evans, 1998).

Az articsóka szív- és érrendszeri hatásairól azt feltételezték, hogy kapcsolatban áll az endoteliális nitrogénmonoxid szintetáz (eNOS) génexpresszió upregulációjával (felülszabályozás), amely egy fokozott nitrogénmonoxid termeléshez és vazodilatátor aktivitáshoz vezet, tenyésztett humán köldökzsínór endoteliális sejteken bizonyítva mindezt (Li *et al.*, 2004; Lupattelli *et al.*, 2004). Továbbá az articsóka koleszterinszint csökkentő hatása alapvetően hozzájárulhat a szív- és érrendszeri védőhatáshoz. Először a cinarinról, az articsóka kivonatok egyik polifenol összetevőjéről feltételezték azt, hogy csökkenti a szérumban a koleszterin és triglicerid szinteket, mely hatást *in vitro*, állatokon végzett kísérleti tanulmányok során elemezték (Lietti, 1977; Wojcicki, 1978). Azonban a luteolint, az articsókában is fellelhető egyik flavonoidot találták felelősnek a koleszterin szintézis gátlásáért, míg a cinarinak nem volt hatása a koleszterin szintézisre (Gebhardt, 1996). További, fehérpatkányokon végzett kutatások során bizonyítást nyert, hogy az articsóka kivonatok megakadályozhatják az ateroszklerotikus plakkok (érelmeszesedés) kifejlődését (Samochowicz, 1962). Az articsóka érelmeszesedés elleni hatását részben szintén az antioxidáns hatásának tulajdonították, amely ezáltal csökkenti az LDL (low-density lipoproteinek) oxidációját (Brown és Rice-Evans, 1998), részben pedig a koleszterinszintézis gátlásának köszönhető (Wegener, 1995). Újabb mind a

caffeoylquinic savak-ról, mind a luteolin-glükozidok-ról azt feltételezik, hogy szerepet játszhatnak az articsóka érelmeszesedés gátló hatásainak kialakulásában (Wang *et al.*, 2003). További megfigyelések azt mutatták, hogy az articsóka pozitív hatásokat fejtett ki a szérum lipid profiljára és a vér glükózsintjére is. Továbbá articsóka leveléből készített kivonatokról azt is kimutatták, hogy növeli a gyulladáscsökkentő választ a nem alkoholos steatohepatitises patkányokban (Safaa *et al.*, 2013) és a nem alkoholos zsírmájjal rendelkező betegekben (Rangboo *et al.*, 2016).

In vitro kutatásokban kimutatták, hogy a kerti articsókából izolált inulin hatékony prebiotikus stimuláló a jótékony *Bifidobacterium bifidum* számára (Lopez-Molina *et al.*, 2005). Taper és Roberfroid (1999) állatkísérletekben megállapította, hogy az inulin jelentősen gátolja a daganatok növekedését. Az inulin egy prebiotikum, ami azt jelenti, hogy növeli a vastagbél mikrobiomjának aktivitását, állandó fenntartását és ezáltal erősíti a szerzett immunitással kapcsolatos válaszok hatékonyságát. Az inulin olyan vízben oldódó, nagyméretű poliszacharid, melyet a zöldségek és gyümölcsök fruktooligoszacharid része tartalmaz. Az emberi szájban és az emésztőrendszerben sincs olyan enzim, amely képes lenne feloldani vagy megemészteni, ezáltal a hasznos baktériumok táplálására szolgál és elősegíti ezek szaporodását (Liu *et al.*, 2016; Valerio *et al.*, 2006). Mivel az inulin természetes cukorpótló, nem növeli a vércukorszintet és lebontásához sem szükséges inzulin (Liu *et al.*, 2017). Élettani hatásai között megemlíthető még a cukoranyagcsere szabályozása, a zsírok lebontása, az ásványi anyagok hatékonyabb felszívódása, a bél pH értékének előnyös befolyásolása (Jasso-Padilla *et al.*, 2017), jótékony hatású lehet továbbá az ételmiszer-allergia, a szív- és érrendszeri betegségek, a vastagbélrák, valamint az emlőrák megelőzésében is (Kumar *et al.*, 2016).

Az articsóka kivonatok tumorelleses hatásait is vizsgálták és megfigyelték, hogy a benne lévő antioxidánsok, mint például a rutin, a quercetin és a galluszsav képesek voltak csökkenteni a leukémia sejtek viabilitását az apoptózis indukálásával (Nadova *et al.*, 2008). Olyan kísérleti körülmények között, amikor az MDA-MB231 humán mellráksejteket rövidebb időtartamig inkubáltak az articsóka termésének (ehető nyers rész) nagy koncentrációjú kivonatával, az elindította az apoptózist és gátolta a tumor progresszióját (Mileo *et al.*, 2012). Alacsonyabb koncentrációjú articsóka kivonatokkal, a hosszabb inkubációs idejű kezelésnél tapasztalták a mellráksejtek növekedésének gátlását, az epigenetikus és a ROS (Reactive Oxygen Species; reaktív oxigén fajták) mediált öregedésen keresztül (Mileo *et al.*, 2015). Megállapították továbbá, hogy az

articsóka terméséből készült, magas polifenol-tartalmú kivonatok csökkentették a sejtek viabilitást a humán májrák (HepG2) esetén, apoptózist indukálva dózisfüggő módon (Miccadei *et al.*, 2008). A vad- és a termesztett articsóka fajok vegetatív részeit is használták különböző kivonatok elkészítéséhez, melyek hatásait DLD1 kolorektális sejteket használva vizsgálták (Simsek és Uysal, 2013). Az így kezelt sejtek apoptózisba léptek a DNS-ük fragmentálódása során, mialatt a proapoptotikus *BAX* gén indukciója és az antiapoptotikus *Bcl-2* génexpressziójának gátlása volt megfigyelhető. A tenyésztett malignus pleurális (mellhártya) mezoteliom sejtek kifejezett citotoxikus hatást mutattak, amikor articsóka levélkivonattal kezelték őket, majd a kísérlet során azonosított hibás szabályozási útvonalakat hozták kapcsolatba a rák kialakulásával és progressziójával (Sharma *et al.*, 2016). Annak érdekében, hogy a megfigyelt hatásokat hozzárendeljék a bioaktív összetevőkhöz, *in silico target* jóslást végeztek, mely során 47 összetevőt fedeztek fel 93 génnel kapcsolatban, amelyeknek szerepe lehet a rákos sejtek transzformációjában, túlélésében és ellenállóképességében, beleértve az apoptózis aktiválását és az invázió korlátozását is (Pulito *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2016).

A fentiekben említett kutatási eredmények azt sugallják, hogy az articsóka citotoxicitást mutat különböző típusú rákos sejtek kapcsán, és ezeket a hatásokat különböző bioaktív összetevők generálják, feltehetőleg többféle celluláris mechanizmuson keresztül. Azért, hogy elemezzem az articsóka bioaktív hatóanyagait és ezekkel összefüggésben a feltételezhető rákellenes hatását, UHPLC-ESI-MS analitikai kémiai, majd *in vitro* és *in vivo* hatástani vizsgálatokat végeztem két különböző (vizes és alkoholos) articsóka kivonaton.

2.2. A görögszéna (*Trigonella foenum-graecum* L.) botanikája és farmakológiája

A görögszéna (*Trigonella foenum-graecum* L.), más néven görög lepkeszeg a legrégebbi korok óta ismert gyógynövények egyike, mely a pillangósvirágúak (*Fabaceae*) családjába tartozik (2. ábra). Főleg Egyiptomban termesztik kultúrnövényként, de a Földközi-tenger keleti partvidékét érintő országokban is őshonos. Az elágazó szára 45-60 cm magas, melyen a lándzsa alakú hármasan összetett levélkék enyhén fogazottan helyezkednek el. Sárgásfehér virágai a lomblevelek hónaljában képződnek, termése lapított, csőrszerű hüvelytermés, melyben a hosszúkás, éretten sárgásbarna magvak ülnek (12-17 db; Petropoulos G.A., 2002).



2. ábra: Görögszéna (Internet2)

Magja 4-5 mm hosszú, kemény (3. ábra), és magas szaponin- illetve galactomannántartalma miatt vízben erősen megduzzad. Csírázó képességét 1-2 évig is megőrzi, ezermagtömege 11,5-11,8 g. Gyökere karógyökér. Hazánkban vadon nem található, de Dr. Makai Sándor révén államilag minősített, szabadalmaztatott ÓVÁRI-4-es fajtával rendelkezünk. A görögszénát Ázsiában takarmányként is hasznosítják, szénáját elsősorban lovakkal etetik. Tejelő állatok zöldtakarmányként történő ellátásánál ügyelni kell arra, hogy nagyobb mennyiség etetésekor a tej átveheti a görögszéna jellegzetes illatát. A görögszéna magját porszerűen megőrölve fűszernövényként is használják, főleg Indiában (Sváb, 1993).



3. ábra: Görögszéna mag (Internet3)

A görögszéna (*Trigonella foenum-graecum* L.) számos bioaktív komponenset tartalmazó növény és több farmakológiai tulajdonsággal is rendelkezik (Yadav *et al.*, 2014; Moradi és Moradi, 2013; Mehrafarin *et al.*, 2010).

A görögszéna leveléből készített kivonatok fájdalomcsillapító hatását kimutatták patkányokon a gerincvelői 5-HT receptor (szerotonin, 5-hidroxi-triptamin) rendszeren vagy purin receptorokon (Parvizpur *et al.*, 2004, Parvizpur *et al.*, 2006). A görögszéna mag vizes kivonatának és magspecifikus polifenol kivonatának májvédő hatását patkány modellrendszeren igazolták (Kumar és Bhandari, 2013; Kaviarasan *et al.*, 2008). A görögszéna vérsírcsökkentő (hypolipidémiás) hatását szintén vizsgálták állatmodelleken és azt találták, hogy csökkenti a trigliceridek, az összkoleszterin, illetve a kis sűrűségű lipoproteinek (LDL) szintjét (Al-Habori és Raman, 1998; Al-Habori *et al.* 1998; Petit *et al.*, 1993; Petit *et al.*, 1995; Stark és Madar, 1993; Valette *et al.*, 1984). A vérsírcsökkentő hatást feltehetőleg a szaponinok okozhatják, ami egy olyan molekulacsoport, amely a gasztroenterális traktusban szapogeninné alakul át. A szapogeninek növelik az epével történő koleszterin szekréciót, csökkentve ezzel a szérum koleszterin szintet (Sauvarie *et al.*, 1991; Yoshikawa *et al.*, 1997; Varshney és Sharma, 1966).

A hipoglikémiás (vércukorcsökkentő) hatásokat többek között a görögszéna magban fellelhető ritka aminosavnak, a 4-hidroxi-izoleucin-nek (4-HIL) tulajdonítják, amely fokozza a glükóz által indukált inzulin kiáramlást *in vitro* humán- és patkány hasnyálmirigy szigetsejteken (Broca *et al.*, 2004; Sauvarie *et al.*, 1998). Az inzulin szekréció stimulálásán túl, a 4-HIL csökkentette az inzulin rezisztenciát (IR) izomban és/vagy májban, aktiválva az inzulinreceptor- szubsztrát asszociált foszfoinozítid 3 (PI3) kináz aktivitását (Jetté *et al.*, 2009). Továbbá a 4-HIL gátolhatja a palmitát indukálta ROS-asszociált gyulladást, és visszaállíthatja az inzulin érzékenységet, szabályozva az inzulin receptor szubsztrát-1 (IRS-1) funkcióját (Maurya *et al.*, 2014). Egy másik *in vitro* tanulmány szerint a görögszéna mag kivonat többféle fehérjét képes foszforilálni, beleértve az inzulin receptort, az inzulin receptor szubsztrát-1-et és a PI3-K p85 alegységét, mind 3T3-L1 adipocitákban (zsírsejt) és humán hepatoma (hepatocelluláris karcinóma, májdaganatos sejt) HepG2 sejtekben, az inzulin jelátviteli út aktivációjához vezetve zsírsejtekben és májsejtekben (Vijayakumar *et al.*, 2005). Azt is kimutatták továbbá az inzulin rezisztens HepG2 sejteken, hogy a 4-HIL javítja az IR-t különböző mechanizmusokkal: (i) 4-HIL csökkentette a TNF- α szintet, a TACE/TIMP3 (TNF- α konvertáló enzim/metalloproteináz-3 szövetinhibitor) rendszer fehérje expresszióját

befolyásolva, és (ii) a 4-HIL stimulálta az inzulin receptor szubsztrát-1 (IRS-1) és a glükóz transzporter négyes típusát (GLUT4) (Gao *et al.*, 2015). Egy összehasonlító tanulmányban HepG2 sejteket használva kimutatták, hogy a görögszéna mag vizes kivonata, a 4-HIL és a metformin (gyógyszer) hasonló antihyperglükémiás hatást vált ki, a fokozott inzulin jelátvitel, a génexpresszió és a glükózfelvétel fokozása által (Naicker *et al.*, 2016). A 4-HIL gyulladáscsökkentő hatását is vizsgálták TNF- α indukált inzulin rezisztenciában C2C12 vázizomrostokon, ami azt mutatta, hogy a 4-HIL visszafordítja az IR-t az AMP-aktivált proteinkináz (AMPK) aktivációja által és a citokin SOCS-3 (Suppressor Of Cytokine Signaling-3) gátlása által (Gautam *et al.*, 2016). Egy másik tanulmányban azt állapították meg, hogy a 4-HIL mellett a dioszenin, ami a görögszénában is megtalálható szaponin, változásokat indukál a szérumban, a májban, a szívben és az agy lipidprofiljában, nagy zsírtartalmú diéta-sztreptozotocin (HFD-STZ) indukált cukorbeteg patkányokban (Naidu *et al.*, 2015). Raju és Bird (2006) a „Zucker” elhízott/túlsúlyos (fa/fa) patkányokban kimutatta, hogy a görögszéna magok szájon át történő bevitele csökkentheti a máj elzsírosodását, a szérumban és a májban TNF- α szintek modulálásával. Továbbá humán kísérletek során a görögszéna az inzulin receptorok számának növelésével csökkentette az IR-t (Raghuram *et al.*, 1994), az adiponectin (hormon) szinteket és a PPAR γ fehérje expresszióját patkányokban (Mohammadi *et al.*, 2016). Egy másik kísérletben az alkoholos görögszénamag kivonat növelte a testsúlyt és a glükóz felvételt, csökkentette a szérumban glükózszintet, a glikozilált hemoglobint, a máj glükóztranszportját, a gyulladást fokozó citokineket, a hasnyálmirigy enzimeket és visszaállította a kiürült glikogén raktárakat az izomban és a májban dózisfüggő módon, beleértve a lipidperoxidáció megelőzését és a májban illetve a hasnyálmirigyben GSH (glutathion) és SOD (szuperoxid diszmutáz) aktivitásának visszaállítását (Joshi *et al.*, 2015).

A görögszéna magok antioxidáns tulajdonságairól azt feltételezték, hogy hozzájárul az egészségvédő hatásához (Srinivasan, 2014). Egy etanolos toxicitási vizsgálatra alapuló patkány tanulmányban, a görögszénamag vizes kivonata megakadályozta a lipidperoxidáció fokozódását és növelte az antioxidáns potenciált (Thirunavukkarasu *et al.*, 2003). Egy *in vitro* szén-tetrakloriddal (CCl₄) kezelt patkány toxicitási tanulmányban, a görögszéna mag és a magkivonat bevitele, jótékony hatással volt a máj és vese védelmében az antioxidáns hatásain keresztül, az antioxidáns enzimek aktivitásának változtatásával (Mbarki *et al.*, 2017). Ezeket az eredményeket *in vitro* bizonyítékok is alátámasztják cukorbeteg emberi vörösvértestekben, mivel a görögszéna magból származó fenolos savak a lipidperoxidáció koncentrációfüggő gátlását mutatták

(Kaviarasan *et al.*, 2004). További patkánykísérleteken alapuló kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a görögszénának erőteljes antioxidáns hatása van, mely által alkalmas lehet rákterápiában a ciszplatin-indukálta vese és máj toxicitás csökkentésére (Hegazy *et al.*, 2015). Valóban egy másik vizsgálat során, a görögszénamag kivonat csökkentette a ciszplatin-indukálta reprodukciós toxicitást patkányokban a here (Leydig sejtek) oxidatív stressz és a gyulladások mérséklésével (Hamza *et al.*, 2016). Érdekes módon, egy cukorbeteg patkányokon alkalmazott 15 napos görögszénamag kezelés, a hipoglikémiás hatás mellett, javította a rendellenes H₂O₂-, MDA-, 4HNE-szinteken, növelve a SOD, GPx és Cat enzimek aktivitását, éppen ezen enzimeket kodoló gének expressziójának fokozása által a májban és agyban (Sharma *et al.*, 2015). Egy összehasonlító tanulmányban a görögszéna levél- és magkivonatok antioxidáns potenciálját értékelték, beleértve az összpolicifenoltartalmat, a gyökbefogó aktivitást (DPPH; FRSA, Free Radical Scavenging Assay), a szuperoxid anion aktivitást, a redukáló kapacitást, a lipid peroxidációt, a vas tiocianát próbát, a hidroxil gyökfogó aktivitást és a DNS károsodás elleni védőaktivitást (Singh *et al.*, 2014). Az eredmények azt mutatták, hogy a görögszéna levélkivonatának volt a legalacsonyabb szabadgyök és szuperoxid anion és hidroxil gyökfogó aktivitása, a legnagyobb redukáló kapacitással egyetemben. Továbbá a görögszéna levélkivonata mutatta a maximális DNS károsodással szembeni védelmet és a bioaktív hatóanyagok magasabb koncentrációját. A magkivonat, a lipidperoxidáció gátlásában mutatott maximális hatást. A görögszéna magok bevétele a karcinogenezis indukálta vastagbélrákos patkányok diétája során, szignifikánsan csökkentette a lipidperoxidációt és egyidejűleg növelte az olyan keringő antioxidánsok szintjét, mint például az aszkorbinsav, E-vitamin, glutation, glutation peroxidáz, glutation S-transzferáz, szuperoxid dizmutáz és a kataláz szintjét (Devasena és Menon, 2002).

A fent említett kísérletek egyértelműen a görögszéna rákellenes hatásait erősítik meg (Jesus *et al.*, 2016; Sung *et al.*, 2012; Aggarwal *et al.*, 2008). Vastagbélrák esetén a görögszéna magok rákellenes hatásait az élelmi rost-, a flavonoid- és a szaponin tartalmának tulajdonítják, amelyek modulálták a béta-glükuronidáz és micináz enzimek aktivitását (Devasena és Menon, 2003). Sok figyelmet fordítottak a görögszéna magból származó dioszgeninnek, mivel az gátolni tudta a vastagbél aberráns kripta fókuszok (ACF) képződését és apoptózist indukált a humán vastagbélrák sejtekben (Raju *et al.*, 2004). A vegytiszta dioszgenin és a görögszénából izolált dioszgenin is gátolta a telomeráz aktivitást, azáltal hogy lecsökkentette a humán telomeráz reverz transzkriptáz gén (hTERT) génexpresszióját (receptorszám változtatásával), és ilyenformán

elősegítette az A549 tüdőráksejtek túlélését (Rahmati-Yamchi *et al.*, 2014). Néhány humán emlőtumoros sejtvonal esetén kimutatták, hogy a dioszgenin gátolta a *pAkt* gén expresszióját és az Akt-kináz aktivitást a PI3 kináz expressziójának befolyásolása nélkül, mely a „downstream target”-ek gátlását eredményezte, ilyen például az *NF- κ B*, a *Bcl-2*, *survivin* (apoptózis-inhibitorfehérje; IAP) és a XIAP (X-kapcsolt apoptózis-gátló fehérje; X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein), (Srinivasan *et al.*, 2009). A Raf/MEK/ERK jelátviteli útvonalat, az Akt-nak egy másik funkcionális „downstream target”-jét ugyancsak gátolta a dioszgenin az ösztrogén receptort kifejező (ER+) MCF-7 sejtekben, a sejtciklus G1 szakaszának leállítását okozva, és „downregulálva” a *ciklin D1*, *cdk-2* és *cdk-4* expressziót, amely a sejt proliferáció gátlásához és apoptózis indukcióhoz vezetett (Srinivasan *et al.*, 2009). Továbbá egy kloroform alapú görögszénamag kivonat hatásosan gátolta a MCF-7 emlőrák sejtek viabilitását, az apoptózis indukálásán keresztül, amely a *caspase-3*, *-8*, *-9*, *p53*, *Fas*, *FADD*, *Bax* és *Bak* gének megnövekedett expresszióján keresztül idő és dózisfüggő módon hatott (Khoja *et al.*, 2011). A rákos sejteket 50 μ g/ml kloroform alapú görögszénamag kivonattal 24 órán át kezelték, és ez a kezelés apoptózist indukált a sejtek 23,2%-ában, míg a 48 órás kezelés a sejtek 73,8%-ának apoptózisát okozta. Egy másik tanulmányban metanol alapú görögszénamag kivonattal kezelték MCF-7 emlőráksejteket és azt találták, hogy a hatása megegyezett a legalább 90%-os metanol kivonattal indukált apoptózissal a Fas receptor által, amely független a *caspase-3*, *-8*, *p53* és *FADD* enzimektől (Alshatwi *et al.*, 2013). Továbbá a protodioszcinről, ami egy másik bioaktív hatóanyag a görögszénamagban, kimutatták, hogy erősen gátolja a HL-60 leukémia sejtek növekedését, viszont kevés hatása volt egy gyomorrák sejtvonal, a KATO III-al történő *in vitro* kísérletek során (Hibasami *et al.*, 2003). A HL-60 sejtek apoptózisa összefügghet a protodioszgenin általi koncentráció és időfüggő DNS fragmentációval. Egy vizes görögszéna kivonat erőteljes citotoxicitást mutatott olyan dagantos sejtvonalakkal szemben, mint a T-sejtes limfóma (TCP), a B-sejtes limfómák, a papilláris pajzsmirigy rák (FRO) és mellrák (MCF-7) esetén, míg normál sejteken, beleértve a humán limfocitákat és a meningeomát (agyhártyadaganat) nem találtak szignifikáns citotoxicitást (Alsemari *et al.*, 2014).

Az összes fent említett kutatási adatsor egyértelműen azt mutatja, hogy a görögszéna szelektív citotoxicitást mutat különböző típusú rákos sejtek esetén, és ezeket a hatásokat különböző bioaktív összetevők generálják, feltehetőleg többféle celluláris mechanizmuson keresztül, amelyek komplexitása további analízist igényel. Azért, hogy fényt derítsek a görögszéna bioaktív hatóanyag tartalmára és a feltételezhető rákellenes

hatására, UHPLC-ESI-MS analitikai kémiai, majd *in vitro* és *in vivo* hatástani vizsgálatokat végeztem két különböző (vizes és alkoholos) görögszénamag kivonaton.

2.3. A növényi eredetű bioaktív hatóanyagok

A természetes eredetű bioaktív hatóanyagok azonosítása és hatásmechanizmusuk felderítése jelentősen változni látszik a posztgenomiális érában. A korábbi kísérleti megközelítések során egy bizonyos bioaktív hatóanyag izolálására, majd szerkezetének meghatározására törekedtek, és ezt követően vizsgálták a homogenitásig tisztított molekula egyed-, esetleg celluláris szintű hatásmechanizmusát. Azonban napjainkban már nem úgy tekintünk a növényi extraktumokra, mint egy bizonyos bioaktív hatóanyag forrására, hanem éppen a nagy áteresztőképességű analitikai kémiai és molekuláris vizsgálatok összekapcsolása révén lehetőség adódik a több komponensű extraktumoknak, mint komplex mátrixoknak a kémiai térképezésére és rendszerbiológiai vizsgálatára. A kémiai térképezés egyszerűen feltételezi a növényi kivonat komponenseinek minőségi és mennyiségi meghatározását, ám a költséghatékonyság érdekében először a hatóanyagokat azonosítjuk be, majd élettani hatást vizsgálunk. Amennyiben a növényi extraktum érdekes élettani hatást generál, úgy rá lehet térni az adott extraktumban már beazonosított hatóanyagok mennyiségi meghatározására, és ezzel párhuzamosan a celluláris és molekuláris hatásmechanizmus(ok) felderítésére. Az alábbiakban röviden áttekintem az általam vizsgált legfontosabb növényi eredetű bioaktív hatóanyagokat.

2.3.1. Az aminosavak

Az aminosavak minden élőlény szervezetének nélkülözhetetlen alkotórészei, a fehérjék építőelemei, melyek strukturális és plasztikus jelleggel rendelkeznek. Humán táplálkozásbiológiai szempontok alapján a húsz ismert aminosav közül megkülönböztetünk kilenc, ún. esszenciális aminosavat, amelyeket táplálékkal kell felvenni, mivel az emberi szervezet egyáltalán nem, vagy nem elegendő mennyiségben képes csak előállítani (valin, leucin, izoleucin, fenilalanin, triptofán, metionin, treonin, lizin, hisztidin). A többi tizenegy olyan nem-esszenciális aminosav, amelyet a szervezetünk elő tud állítani (alanin, arginin, aszparagin, aszparaginsav, cisztein, glicin, glutamin, glutaminsav, prolin, szerin, triozin), (Boross és Sajgó, 2003). Ha ez nem történik meg, akkor megfelelő táplálkozás mellett is súlyos hiányjelenségek léphetnek fel, mint a növekedés leállása, érdes bőr és ödéma (Dési, 2001; Machovich, 2004). A

fehérjét alkotó aminosavak mellett, a sejtek minden aminosavat szabad formában is tárolnak. Ezek a szabad aminosavak vitaminok, hormonok és új fehérjék szintézisében vesznek részt. A sejtek nem közvetlenül érzékelik a bennünk található szabad aminosav mennyiséget (eltekintve a leucintól), hanem pontosabban a szabad tRNS-ek jelzik a GCN2/Eif2 α /ATF2/4/CHOPS intracelluláris jelátviteli útvonalon ezek hiányát és olyan gének expresszióját indítják be, amelyek bizonyos aminosavak bioszintézisével kapcsolatosak. Ezen kívül vannak más szabad aminosav mennyiséget jelző mechanizmusok is, ám ezek feltárása még korai szakaszban tart (Bruhat *et al.*, 2006).

A javasolt aminosav-egyensúly mértékét a nemzetközi intézetek (FAO/WHO/UNO) a következőképpen határozták meg (Recommended Dietary Allowances, 1989) (1. táblázat).

1. táblázat: Ajánlott aminosav szükséglet (WHO, 1985)

Aminosav szükséglet, mg/kg/nap				
Aminosav	Csecsemő (3-4 hónap)	Gyerek (~ 2 év)	Gyerek (10-12 év)	Felnőtt
Hisztidin	28	-	-	8-12
Izoleucin	70	31	28	10
Leucin	161	73	42	14
Lizin	103	64	44	12
Metionin + cisztein	58	27	22	13
Fenilalanin + tirozin	125	69	22	14
Treonin	87	37	28	7
Triptofán	17	12,5	3,3	3,5
Valin	93	38	25	10
Összesen (hisztidin nélkül)	714	352	214	84

Mindent egybevetve kijelenthető, hogy a növényi extraktumok szabad aminosav tartalma fontos táplálkozásélettani jelentőséggel bír, s bár erre a szerepkörre korábban kevesbé figyeltünk, a jövőben, a természetes kivonatok ezen paraméterét gondosabban kell vizsgálni.

2.3.2. A purinok és a pirimidinek

A pirimidin egy színtelen, kristályos, vízben jól oldódó nitrogéntartalmú heterociklusos vegyület. Számos természetes szerves vegyület alapváza, melynek többféle jelentős származéka létezik. Természetes pirimidinszármazékok (pirimidinbázisok) közül az uracil, a timin és a citozin a nukleinsavak építőkövei. A vitaminok közül pirimidinyűrűt tartalmaz a B₁-vitamin (tiamin). Az RNS-ben a citozin és az uracil fordul elő, míg az uracilt a DNS-ben a metilszármazéka, a timin helyettesíti. A DNS-ben a pirimidinbázisok purinbázisokkal alkotnak párt, a citozin a guaninnal, a timin pedig az adeninnel.

(Internet4)

A purin olyan heterociklikus aromás szerves vegyület, amelyben egy pirimidinyűrű és egy imidazolgyűrű kapcsolódik össze. A purin szilárd, kristályos, vízben és alkoholban jól oldódó vegyület. A természetben számos vegyületben előfordul. Megtalálható például a húgysavban, néhány alkaloidban, mint például a koffeinben és a nukleinsavakban előforduló purinbázisokban, az adeninben és a guaninban.

A purin lebontásának túlterheltségéből köszvényes megbetegedés alakulhat ki, melyet a húgysavval túltelített testfolyadékokból kiváló és a különböző szövetekben lerakódó mononátrium-urát-monohidrát kristályok idézik elő. A köszvényben a húgysavanyagcsere zavarának gyakori velejárója a szénhidrát- és a zsíryananyagcsere zavara is. Diétás étrenddel, a purinfelvétel mérséklésével a vér húgysavszintje csökkenthető.

(Internet5)

2.3.3. Az alkaloidok

Az általában színtelen alkaloidok növényekben találhatóak, nitrogéntartalmú, többnyire heterociklusos vegyületek, melyek jótékony vagy mérgező hatásukkal befolyásolják szervezetünk működését. Főleg a központi idegrendszert befolyásolják, valamint fájdalomcsillapító, izgató és élénkítő hatást fejtenek ki (Bordás és Tompa, 2006). Szabad állapotban vízben rosszul oldódnak, savakkal viszont könnyen kristályosodó és jól oldódó sókat alkotnak, az emberi szervezetben erős fiziológiai hatást fejtenek ki ezáltal, a természetben is sóik formáiban találhatóak meg. A növények szekunder anyagcseretermékei, és a fehérjék lebontása során aminosavakból keletkeznek. (Internet6).

2.3.4. A polifenolok

A polifenolok kémiaileg rendkívül változatos molekulák és olyan másodlagos anyagcsere-termékek, amelyeket a növények szintetizálnak, és amelyekből több mint 8000 félét sikerült azonosítani (de Rijke *et al.*, 2006). Polifenoloknak nevezzük azokat a vegyületeket, melyek aromás gyűrűket (p-kumársav) vagy több hidroxilcsoportot kapcsolnak össze. A polifenolokat két csoportba sorolhatjuk: az egyik csoport képviselői a flavonoidok, a másik csoport képviselői a nem-flavonoidok, amelyek lehetnek benzoésav (benzoic acid), hidroxicinnamátok (hydroxycinnamates), stilbenek (stilbenes), lignánok (lignans), galluszsav-tanninok (gallic acid tannins) és gallotanninok (gallotannins). A polifenolok említett két csoportját a további alfejezetekben tárgyalom (2. táblázat).

A polifenoloknak jelentős szerepe van a növények életében, hiszen többek között elősegítik a virág, a gyümölcs és a mag pigmentációját is. Szinte minden biotikus és abiotikus stressz hatására – beleértve a herbivorokat, gombák és vírusok által okozott sérüléseket, sebzést, a szélsőséges hőmérsékletet, az UV sugárzást, az ásványi tápanyagok egyensúlyának a hiányát, az aszályt, a sótartalom változását, az oxigénhiányt, az ózont és a gyomirtókat is – koncentrációjuk növekedhet a vegetatív hajtásokon, gyökereken és a termésben.

In vitro tesztrendszerekben kimutatták a polifenolokról, hogy antioxidáns kapacitással rendelkeznek, valamint azt, hogy elsősorban a H donorként viselkedő hidroxil csoportok száma és elhelyezkedése fokozhatja a polifenol vegyületek antioxidáns hatását (Cao *et al.*, 1997; Shekher Pannala *et al.*, 2001). Ugyanakkor a polifenolok hozzájárulnak az emberi/állati fogyasztók szervezetében a redox folyamatok szabályozásához is.

2.3.4.1. A flavonoidok

A polifenolok alosztályába tartozó flavonoidok az emberi szervezet számára tápértékkel nem rendelkező komponensek, melyek gyümölcsökben, zöldségekben, borokban, teában és a kakaóbabban is fellelhetőek (2. táblázat). Élettani hatásokról, kémiai szerkezetükről számos tanulmány foglalkozott az elmúlt évtizedek során, mely kísérleti eredmények alátámasztották a flavonoidok antioxidáns, gyulladáscsökkentő, antikarcinogén, antiallergén, antibakteriális, májvédő, antitrombotikus, antivirális (vírusölő) és ösztrogén aktivitás hatását (Wang *et al.*, 2003).

2. táblázat: Falvonoid alosztályok, kémiai jellemzőik, élelmiszerek flavonoidjai és élelmiszerforrások (Beecher, 2003; Szekeresné, 2014)

Flavonoid alosztály	B gyűrű kapcsolata C gyűrűhöz	C gyűrű telítetlen kötés	C gyűrű funkcionális csoport	Prominens flavonoidok	Flavonoidban gazdag ételek
Flavanolok	2	nincs	3-hidroxi, 3-O-gallát	Katechin Gallokatechin Epikatechin Epigallokatechin Epikatechin-3-gallát Epigallokatechin-3-gallát	Teák, vörös szőlő, vörös bor
Flavanonok	2	nincs	4-oxo	Eriodictyol Hesperetin Naringenin	Citrus félék
Flavonok	2	2-3 kettős kötés	4-oxo	Apigenin Luteolin Crysin	Zöld leveles fűszerek pl. petrezselyem gyümölcshéj
Izoflavonok	2	2-3 kettős kötés	4-oxo	Daidzein Genistein Glycitein Biochanin A Formononentin	Szója, hüvelyesek
Flavonolok	2	2-3 kettős kötés	3-hidroxi, 4-oxo	Isorhamnetin Kaempferol Miricetin Quercetin Galangin	Általánosan előfordul az ételekben
Flavanonol	2	nincs	3-hidroxi	Taxifolin	Citrus félék
Antocianidinek	2	1-2, 3-4 kettős kötés	3-hidroxi	Cyanidin Delphinidin Malvidin Petargonidin Petunidin Peonidin	Piros, vörös, kék bogyók Pl. vörös áfonya, ribizli stb.

A jelenleg ismert mintegy 5000 különböző flavonoidra a C₆-C₃-C₆ elosztású gyűrűben található alapszénváz a jellemző, ahol a két benzol gyűrű (A és B) egy oxigén atomot tartalmazó heterociklusos pirán vagy piron gyűrűn (C) keresztül kapcsolódik (Bravo, 1998). A flavonoidokat a B és C gyűrű kapcsolódása alapján, valamint az oxidációs státusz és a C gyűrű funkcionális csoportjának megfelelően hét alosztályba lehet sorolni (2. táblázat) (Beecher, 2003; Szekeresné, 2014).

Az egyik leggyakrabban vizsgált vegyület a kvercetin, melynek antimutagén és antikarcinogén hatását számos vizsgálat igazolta. A kvercetin idő és dóziszfüggő módon csökkentette a „triple negatív” emlőrák sejtek viabilitását, mivel a FOXO3A (gén) módosításával leállította a sejtciklust. Ez a rákfajta az emlő rosszindulatú daganatainak

egyik altípusa, amelyben a rosszindulatú sejtek nem rendelkeznek a kétféle hormon- (ösztrogén és progeszteron) és növekedési faktor (HER2) receptorral. A felfedezés jelentősége ezen ráktípus agresszivitása miatt kiemelkedő, hiszen a többi emlőrák típushoz képest gyakrabban ad áttétet más szervekbe (Nguyen *et al.*, 2017b). A flavonoidok jelentős antikarcinogén hatása mellett azok prokarcinogén tulajdonságai is előfordulhatnak, melyeket patkánykísérletek támasztanak alá. Kutatások megállapították, hogy 0,1% étrendi kvercetin intesztinális és húgyhólyag karcinómát okozott patkányokban, valamint megnövekedett májtumor incidencia is megfigyelhető volt. Más kísérletek igazolták, hogy magas dózisu (5% flavonoid az étrendben) kvercetin fogyasztása 2 éven keresztül hím patkányokban növelte a vesedaganat kialakulásának mértékét, mialatt rövidebb ideig tartó alacsonyabb dózisu fogyasztás nem okozott káros hatásokat (Pamukcu *et al.*, 1980; Dunnick és Hailey, 1992; Lugasi, 2001).

2.3.4.2. A kumarinok

A legegyszerűbb csoportosítás szerint a fenolos komponenseket két főcsoportba sorolhatjuk, a flavonoidok és a nem-flavonoidok közé. A nem flavonoidok csoportja tartalmazza az egyszerű fenolokat, a fenolos savakat, kumarinokat, xantonokat, kalkonokat, sztilbéneket és lignánokat. A kumarinok a fenil-propanoidokhoz tartoznak, fenolos sav származékoknak tekinthetőek, melyek a hidroxifahéjsavak laktonjai. Természetes körülmények között a növényekben mind szabad és glikozidos kötésben is megtalálhatóak, amelyek a cukor-anyagsere termékeként jönnek létre (Szilvássy, 2014).

Kémiai fő hatóanyagukból adódóan, hatásaik szerint megkülönböztetünk hidroxikumarinokat, funarokumarinokat, piranokumarinokat és dikumarinokat. A hidroxikumarinok a kevésbé károsnak tekintett UV-tartományban (320-400 nm) fokozott mértékben képesek az ultraibolya sugarak abszorbeálására, eszkuilin tartalma által pedig fokozódik az érfal rugalmassága. A funarokumarinok fokozzák a pigmentképződést, míg a piranokumarinok tágítják a szív koszorúért, ezáltal javítva a szív vérellátását. A dikumarinok véralvadás csökkentő hatásúak, azáltal, hogy a májban gátolják a protrombin (véralvadási faktor) szintézisét, azaz a K-vitamin hatását gátolják (Internet7).

2.3.4. A szaponinok

A szaponinok olyan felületaktív, glikozidos jellegű anyagok, amelyek egy vízdékony és egy vízben nem oldódó molekulát tartalmaznak és vízzel keverve rázatás hatására habot képeznek. Glikozid jellegükből adódóan egy aglikon részből és az ahhoz kapcsolódó oligoszacharidokból épülnek fel (Huber, 2015). Jellegzetes felépítésüknek köszönhetően emulgeáló hatásuk, azaz segítik a zsíroldékony olajok vízben való eloszlását. Kémiai kötésük alapján három csoportba sorolhatóak:

1. A *triterpének* csoportjába számos fitoterápiás célra használt gyógynövény hatóanyaga tartozik, melyeknek a fitofág rovarok szaporodásában vagy a kórokozók elleni védelemben van szerepük.
2. A *szteroid szaponinokat* a mai modern gyógyszeripar állítja elő élelmiszeripari melléktermékből olyan értékes főtermékké, amelyek végül szteroid hormonmolekulákká alakíthatóak. Ilyen például a szója feldolgozása során kinyerhető fitoszterolok vagy a Kabay János világszabadalmán alapuló, mákszalmából előállított opioidok.
3. A *szteroidalkaloidok* por formában ingerlik az orr nyálkahártyáját, míg vízben oldva kesernyés, csípős ízűek.

A szaponinok önmagukban nehezen szívódnak fel, de segítik más anyagok felszívódását. A habzó tulajdonságuknál fogva az élelmiszeripar különböző italok gyártásához, míg a kozmetikai ipar fogkrém, szappan, mosószer és a borotvahab gyártásánál használja fel. A gyógyszerészet gyulladáscsökkentő-, étvágygerjesztő-, ödéma gátló/megszüntető-, stresszoldó- és köptető tulajdonságukat érvényesíti. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy a szaponin-tartalmú ételek, táplálékkiegészítők túlzott fogyasztása nyálkahártya-sérüléseket, gyulladásokat és hányást, hasmenést is okozhatnak (Mester, 2010).

2.3.5. A szteroidok

A szteroidok olyan szteránvázas, természetes szénvegyületek, amelyek a növényi, állati és az emberi szervezetben is előfordulnak. Közéjük tartozik a sejtmembrán felépítésében szereplő koleszterin, különböző hormonok (pl. ivarmirigyek hormonjai) valamint az epe hatóanyagai, az epesavak (Kmeťová *et al.*, 2011).

Az izoprenoidok legfontosabb és legelterjedtebb csoportja a szteroidok, amelyek rendszerint fiziológiailag nagyon hatékonyak és az alapvető szerkezeti egységük a négygyűrűs szterán szénhidrogén. Előfordulásuk és fiziológiai hatásuk alapján a

szteroidokat szterolokra (szterinek), epesavakra és szteroid hormonokra oszthatjuk fel. A szterolok megtalálhatók az állatokban (zooszterolok), a növényekben (fitoszterolok) és a gombákban (mikoszterolok) is. A legelterjedtebb zooszterol a koleszterol (koleszterin), mely az állatok és az emberek szövetének a 0,05-5%-át teszi ki (Huber, 2015). Az epe fő anyagai a májban képződő epesavak. Emulgeáló képességüknek köszönhetően a szervezetben a zsírok emésztésében és felszívódásában egyaránt résztvesznek. Legismertebb közülük a kólsav és a dezoxikólsav. A szteroid hormonok közé a nemi hormonok (tesztoszteron, ösztrogének, gesztagének) és a mellékvese kéregállományának hormonjai (kortikoidok) tartoznak (Kmeťová *et al.*, 2011).

A természetes eredetű szteroidokból kémiai átalakítással, olyan szintetikus származékok nyerhetők, amelyek az eredeti biológiai hatásuk mellett újabb, a szervezet számára hasznos aktivitást is mutatnak (Huber, 2015).

2.3.6. A terpenoidok

A növényvilágban nagyon gyakoriak azok a szénvegyületek, amelyeknek szénváza két vagy több izoprén egységet foglal magában. Az öt szénatomos izoprénváz nagyszámú és igen változatos szerkezetű és biológiai hatású vegyület építőegysége. Ezek a vegyületek két csoportra oszthatók, mégpedig a terpenoidokra és a karotinoidokra. A terpenoidok a természetes anyagok legnagyobb csoportja, több mint 35000 vegyület ismert, amelyek öt szénatomos izoprén egységek összekapcsolódásával jönnek létre.

A terpenoidok körében alapvegyületeknek tekinthetők a névadó terpének, mely szénhidrogénekre a $(C_5H_8)_n$ általános összegképlet jellemző, ahol $n=2$ vagy ennél nagyobb szám. Szerkezetvizsgálatuk szerint ezek a vegyületek az izoprén (C_5H_8) dimer, trimer, általában oligomer vagy polimer származékainak tekinthetők. A $(C_5H_8)_n$ összegképletű, izoprén egységekből álló vegyületeket terpéneknek, az ezekből levezethető szénhidrogéneket és oxigéntartalmú származékaikat terpenoidoknak nevezzük. A terpenoidok főleg fájdalomcsillapító, antibakteriális, antimutagén, antidiabetikus, gyulladáscsökkentő és görcsoldó hatással rendelkeznek (Internet8).

2.3.7. A vitaminok

Vitaminoknak azokat a szerves anyagokat nevezzük, amelyek mind az emberi, mind az állati szervezet egészsége fenntartásához szükségesek, és amelyeket táplálékkal

kell a szervezetbe juttatni. Egyes vitaminok kémiaiilag hozzájuk hasonló szerkezetű anyagokból, az úgynevezett provitaminokból (elővitaminok) képződnek.

A vitaminok oldhatóságuk alapján két fő csoportra (zsírban- illetve vízben oldódóak) oszthatóak, melyek a szervezet védekező mechanizmusát erősítik. A vitaminok élettani hatásai jól ismertek, de a sejtek metabolizmusában kifejtett biológiai hatásuk még nem teljesen tisztázott a zsírban oldódó vitaminok esetében, hiszen hiányuk esetében a különböző enzimek aktivitása megváltozhat és a fehérjék bioszintézisének egyensúlya is felborulhat. Biokémiai szempontból a vízoldható vitaminok fő jellemzője, hogy nagyobb részük a biológiai oxidációt katalizáló enzimek koenzimjeinek alkotórésze.

A vízben oldódó vitaminok feleslegét a szervezet a vizelettel kiválasztja, míg a zsírban oldódó vitaminokat a szervezet tárolni tudja, így a velük kapcsolatos avitaminózis ritkábban fordul elő (Prokisch, 2010). A táplálkozás és az ételek elkészítése során szem előtt kell tartani, hogy főleg hevítés hatására a vitaminok 10-50 százaléka is elbomolhat, de az élelmiszerek nem megfelelő tárolásakor is a vitamintartalom csökkenésére lehet számítani. Az élő szervezetek vitamin ellátottsága kiemelten fontos, hiszen hiányuk esetében hipovitaminózis és avitaminózis is felléphet. A hiány mellett, a túlzott bevétel elkerülésére is ügyelni kell, ellenkező esetben a hipervitaminózis súlyos tünetei jelentkezhetnek.

2.4. A növényi eredetű extraktumok interdiszciplináris jellemzése

A növények szerkezeti és működési integritását számos szerves és szervetlen molekula szavatolja. Ezen molekulák között egyesek makro-, mások mikro-nutriens jelleggel bírnak a növényevők számára. Kutatásaim során – és a jelen disszertációmban is – az ún. bioaktív hatóanyagokra fókuszáltam, mivel ezek fontos szerepet játszanak a növényekkel táplálkozó állati és emberi szervezetekben végbemenő neuro-humorális szabályozásokban és/vagy a celluláris szintű adaptív stresszválaszok hatékonyságában. A növényi eredetű bioaktív hatóanyagoknak az állati és emberi szervezetekkel kapcsolatos funkcióinak a felderítése komplex és interdiszciplináris kísérleti stratégiát feltételez. Mindezt azért kell elvégezni, hogy pontosan megismerhessük a növényi eredetű bioaktív hatóanyagok preventív és/vagy terápiás jellegű humán alkalmazásainak lehetőségeit. Ennek érdekében először elvégeztem a kérdéses növényi extraktumokban található bioaktív hatóanyagok analitikai kémiai beazonosítását, majd teszteltem genotoxikus és

citotoxikus hatásukat. Az alábbiakban röviden ismertetem az alkalmazott kísérleti stratégiával kapcsolatos fontosabb megfontolásokat.

2.4.1. A növényi extraktumok bioaktív hatóanyagainak analitikai kémiai vizsgálata

Az általam vizsgált articsóka és görögszéna extraktumok bioaktív hatóanyagainak meghatározására nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiára és tömegspektrometriára épült UHPLC-ESI-MS rendszert alkalmaztam.

A HPLC (High Performance Liquid Chromatography) módszernél az eluens (mozgó fázis) nyomás hatására áramlik át a kis szemcseméretű állófázison (kolonnán), melyen az elválasztás történik.

Az állófázis és a mozgófázis alapján osztályozzuk a HPLC módszereket (3. táblázat).

3. táblázat: HPLC csoportosítása az állófázis, valamint a mozgófázis alapján (Fekete, 2002)

Kromatográfias módszer	Állófázis minősége	Mozgófázis minősége
Normál fázisú kromatográfia (NP-HPLC)	poláris töltet	apoláris
Fordított fázisú kromatográfia (RP-HPLC)	apoláris töltet	poláris
Ionkromatográfia (IC) Ionpár kromatográfia (MPIC) Ioncserés kromatográfia (HPIC)	apoláris töltet töltéssel rendelkező töltet	poláris oldószer + ionpárképző puffer oldat
Ion kizárásos kromatográfia (HPICE)	kationcserélő töltet	puffer oldat
Méretkizárásos kromatográfia (SEC)	nagy pórusátmérővel rendelkező töltet (gél)	víz vagy szerves oldószer

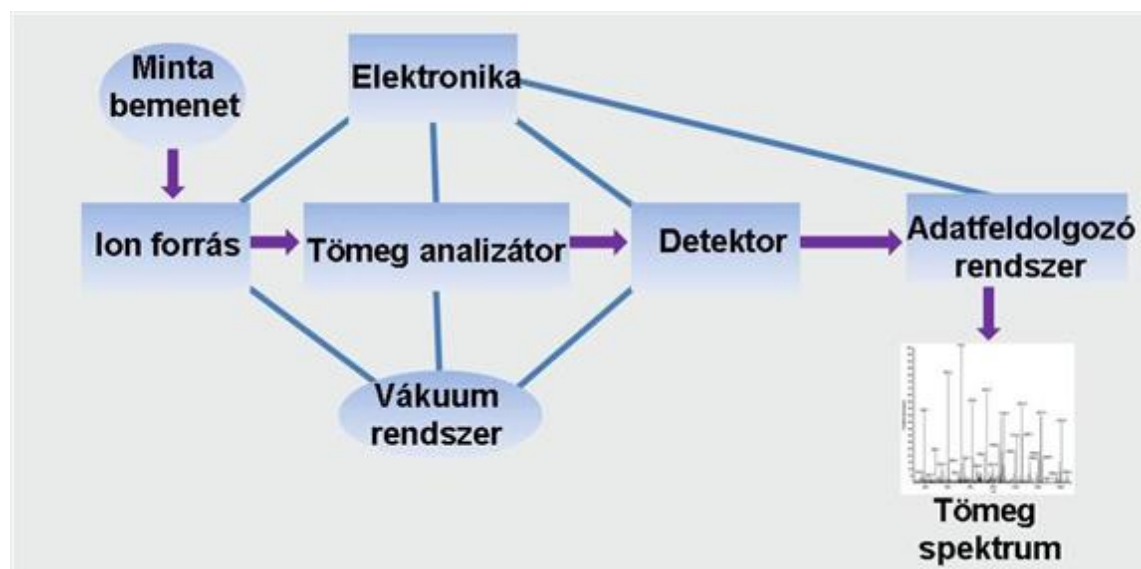
A mintát impulzusszerűen az eluensáramba juttatjuk (injektáljuk). A komponensek megoszlanak az eluens és az álló fázis között. Az állófázishoz legkevésbé kötődő komponens halad az eluens segítségével a leggyorsabban, és ez hagyja el először az oszlopot. Az oszlopot elhagyó anyagáramot a detektorba juttatjuk. A detektor a pillanatnyi koncentrációval arányos jelet szolgáltat, valamilyen anyagi tulajdonság mérése alapján. A kapott jel időbeli változását rögzíti a kromatogram.

Leggyakrabban használt detektorok:

- UV, UV-Vis, abszorpciós detektorok,
- vezetőképességi detektorok,
- törésmutató különbség mérésén alapuló detektorok,
- fényszórás mérésén alapuló detektorok,
- tömegspektrométerek.

A tömegspektrometria (Mass Spectrometry, MS) tömegmérésen alapuló analitikai vizsgálati módszer. Feltalálása J. J. Thompson nevéhez köthető, aki az 1900-as években a „pozitív elektromos sugarakról” és azok felhasználásáról írt. A tömegspektrometriai vizsgálatok tették lehetővé az izotópok felfedezését és vizsgálatát, később pedig a szerves vegyületeket is ilyen módon elemezték. Mára egy korszerű és hatékony módszerré fejlődött (Pokol *et al.*, 2011).

A tömegspektrométer egy olyan berendezés, melyben semleges részecskékből (molekulákból, atomokból) ionokat állítunk elő, majd ezeket az ionokat elektromágneses terek segítségével tömeg/töltés (m/z) arányuk szerint elválasztjuk. Az elválasztott ionok intenzitását a detektor méri, s így egy ionáram intenzitás - fajlagos tömeg függvénykapcsolathoz, az ún. tömegspektrumhoz jutunk. A tömegspektrometria előnye, hogy kis mennyiségű mintából kiindulva is meghatározhatók a minta alkotói. Gyors, az elemzések akár 20-30 perc alatt is végrehajthatóak. Felhasználása rendkívül széles körben lehetséges, az orvostudomány, gyógyszerészet, élelmiszeripar és a környezettudomány számára is nagy jelentőséggel bírnak a tömegspektrometriai mérések (Pokol *et al.*, 2011).



4. ábra: A tömegspektrométer vázlatos felépítése (Internet9)

Ahogy a 4. ábra is szemlélteti, a tömegspektrométer felépítése a következő:

A mintabevitel

Gáz, szilárd és folyékony halmazállapotú minta is vizsgálható. Amennyiben egy komponensű a minta, akkor direkt befecskendezéssel is bejuttatható, ha több komponensből áll, akkor egy preparatív elválasztást célszerű végezni (pl.: gázkromatográfia, folyadékkromatográfia).

Az ionforrás

A molekulákat ionná alakító és a képzett ionokat az analizátorba juttató egység az ionforrás. A múltban leggyakrabban az elektronütköztetési ionizációt (EI) használták. Egy izzó katód szál elektronokat bocsát ki, melyek a molekulákkal, atomokkal ütközve ionizálják azokat. Itt a mozgási és ütközési energia miatt következik be az ionizáció.

Napjainkban a kapcsolt technikák (HPLC-MS) robbanásszerű elterjedése miatt a leggyakrabban használt ionizációs módszer az elektropray ionizáció (ESI). A mintaoldatot egy nagyfeszültségű kapillárison keresztül juttatjuk az ionforrásba. A kapilláris csúcsáról töltéssel rendelkező folyadékcseppek szakadnak le, melyekből az oldószert szárítógáz (általában nitrogén) segítségével távolítjuk el. A visszamaradt, töltéssel rendelkező molekulákat/atomokat juttatjuk az analizátorba.

A tömeganalizátor

Az analizátorban történik meg az ionizáció során létrejött ionok szétválasztása. Napjainkban a leggyakrabban használt analizátorok a következők:

A kvadrupól (négy pólusú) analizátor 4 darab, négyzet alakban elrendezett, elektromosan vezetőképes rúdból áll. A rudakra egyen- és váltófeszültséget is kapcsolunk úgy, hogy az átlósan egymással szemben elhelyezkedő elektródok potenciálja megegyezzen, az egymás melletti rudak potenciálja pedig ellentétes előjelű legyen. Az ionforrásból kilépő ionok a gyorsító feszültség hatására hosszanti irányból belépnek a rudak közti térrészbe, majd az analizátorban a folyamatosan változó kvadrupólus elektromágneses tér hatására fajlagos tömegüktől függő pályára állnak.

Az ioncsapda tömeganalizátor három hengeresen szimmetrikus elektródból áll. A csapda belsejében az elektródokra kötött egyen- és váltófeszültség hatására egy alternáló, háromdimenziós kvadrupólus tér alakul ki, melynek hatására a minta ionjai körpályára állnak. A pálya sugarának nagysága az ionok tömeg/töltés hányadosától függ. Ideiglenesen ezen a jellemző körpályán maradnak az ionok, majd az elektromágneses teret megváltoztatva az m/z hányadosuk alapján kilépnek az analizátorból (Pokol *et al.*, 2011).

A repülési idő analízátor (TOF) esetében az ionforrásban előállított ionok egy gyorsító feszültség hatására elindulnak az analízátor felé. Töltéssel rendelkező részecskék elektrosztatikus térben a töltésükkel arányos kinetikus energiára tesznek szert. Az azonos kinetikus energiával rendelkező, de különböző tömegű ionok különböző sebességgel repülnek, tehát a repülési csőben elkülönülnek, majd különböző időben érik el a detektort.

Az orbitrap analízátor (ESI) egy három elektródából felépülő elektrosztatikus ionsapda. Két, hordó formájú elektróda között található az orsó alakú harmadik elektróda. A beinjektált ionok a belső elektród körül spirális mozgást (m/z szerint körpályán) végeznek. Az ionok oszcilláló mozgásának következtében a belső elektromos tér változik, ezt méri a készülék. Az orbitrap analízátorral nagy felbontást és tömegpontosságot lehet elérni.

Az UHPLC-ESI-MS/MS kapcsolt módszer

A berendezés HPLC és MS készülékek kombinálásának tekinthető. A minta komponenseinek a szétválasztását és a tömegspektrométerbe juttatását a folyadékkromatográf végzi. A tömegspektrométer ebben az esetben egy univerzális detektornak tekinthető. A folyadékkromatográfiás elválasztás minden időpillanatában tömegspektrumokat vehetünk fel a kolonnából kilépő anyagokról. Megfelelő tömegspektrométer alkalmazása esetén (pl. orbitrap technológia) a tömegmérés pontossága 5 parts per million (ppm) alatti. További információkat nyerhetünk a vizsgált anyag szerkezetéről annak fragmentálásával (megfelelő energiájú nitrogéngáz molekulákkal történő ütköztetés után), a molekulaion és a fragmensek pontos tömegének elemzésével.

2.4.2. A növényi extraktumok genotoxikus hatásának vizsgálata *Drosophila melanogaster*-en

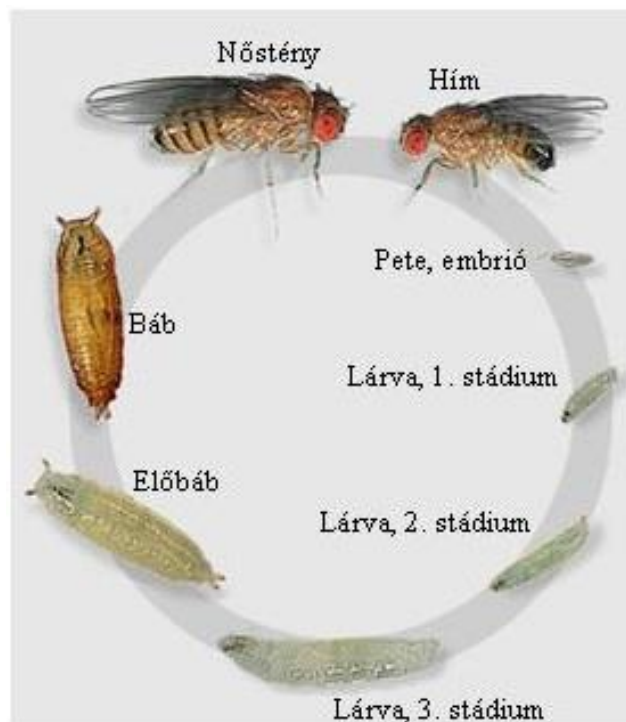
A genotoxikus hatás vizsgálata során a *Drosophila melanogaster* (ecetmuslicát) alkalmaztam. Tudományosan igazolt, hogy az ecetmuslicára jellemző génexpresszió-szabályozás, sejtvezérlés, idegrendszer- és szinapszis szerkezet és működés, immunválasz, embrionális fejlődési programok, sejtciklus szabályozás, sejtek közötti kommunikáció, sejten belüli jelátviteli útvonalak és sejthalál mind nagyfokú homológiát mutat az emberben megfigyelhető hasonló jelenségekkel. Így érthető, hogy a muslicán megtanultak közvetett kísérleti bizonyítékként értelmezhetők, és irányelvként alkalmazhatók az ember esetében.

A Drosophila melanogaster, mint genetikai modell rendszer

Az ecetmuslicát már több mint egy évszázada használják modell élőlényként élettudományi kutatásokban. Frank E. Lutz 1900-as évek elején kifejezetten a *Drosophila melanogaster* fejlődési szakaszait vizsgálta, ezen belül is az egyéni tulajdonságok öröklődését figyelte. Lutz javasolta Thomas Hunt Morgan-nek, a Columbia Egyetem professzorának (1866-1945) 1906-ban a *Drosophila melanogaster* használatát. Morgan 1933-ban Nobel-díjat kapott a kromoszómákon elhelyezkedő géneknek az öröklődésben játszott szerepének igazolásáért. Hermann Joseph Muller 1946-ban fiziológiai Nobel-díjat kapott a röntgen sugárzás mutagén hatásának felfedezéséért a muslicán. Ezen felül a *Drosophila melanogaster*-rel végzett kísérletek további korszakalkotó felfedezésekhez vezettek az anyai hatás és embriogenezis, a sejt és szöveti differenciáció (Eric Wieshaus és Cristiane Nüslein Volhard, orvosi Nobel díj 1998), és a veleszületett immunitás (Julius Hoffman, orvosi Nobel díj 2004) területén. Az ecetmuslicát a mai napig használják olyan betegségek genetikai alapjainak a kutatásánál, mint például a rák, az Alzheimer- és Parkinson-kór, a diabétesz és a metionin szintézis zavar. Az emberi betegséggel kapcsolatos lókuszek 75%-a *Drosophila* ortológ. A *Drosophila melanogaster* újabb előnye, hogy teljes genomjának nukleotid szekvenciája 2001 óta ismert, így tudjuk, hogy $1,65 \times 10^8$ bázispárból áll, ami megközelítőleg 13600 gént tartalmaz. Mi több, a genomjában lévő minden génre vannak funkció-vesztéses és alkalomadtán funkciónyeréses mutáns vonalak, amelyek lehetővé teszik az egyes életjelenségek genetikai szabályozottságának felderítését. További előnye, hogy a balanszer kromoszómák révén megakadályozható a meiotikus rekombináció, azaz a mutációk mindvégig az eredeti kromoszómán maradnak. Fontos kiemelni, hogy a muslica imágók ivari dimorfizmusa egyértelmű, így a keresztezések irányíthatóak és a balanszer kromoszómák alkalmazásával egyetemben egyértelműen prediktálható az adott szülői keresztezésből származó F1 (első generáció) utódok genotípusa és fenotípusa (Deák, 2014; Szabad, 2016).

Az ecetmuslica teljes átalakulással fejlődő rovar. A peték 0,5 mm hosszúak, ebben történik az embriogenezis. A pete kettős burokkal körülvett, ovális alakú, az elülső háti részén „mikropile” található, ez a spermium behatolási helye. A petéből 22-24 óra elteltével 25°C-on kikel a lárva. A lárvaállapotnak három stádiuma van (L1, L2, L3), ezeket két vedlés választja el egymástól. A lárva életszakasz 25°C-on összesen négy napig tart, ami közben a lárva testtömege megszázsorozódik. Az embrionális és

lárvális életszakaszban kétféle sejttípus van jelen, az imaginális és a lárvális sejtek. Az imaginális sejtek diploidok, folyamatosan osztódnak és később a kifejlett imágó szöveteinek és szerveinek kialakításában vesznek részt. Ellenben a lárvális sejtekkel, amelyekben többszörös DNS replikáció történik, de nem osztódnak csak térfogatban növekednek és sejtmagjaikban politén óriáskromoszómák alakulnak ki. Az első és második lárvafázisuk egy-egy napig, a harmadik pedig két napig tart. Az eddigi állapotok alatt a *Drosophila* a táptalajban tartózkodik, azonban a lárvaállapot utolsó 8 órájában a táptalajt elhagyja és bebábozódik. A nyálmirigy váladékával a hasi oldalát rögzíti a fiola oldalához, és előbábbá majd bábbá alakul. Ebből 4 nap elteltével kikel a kifejlett imágó egyed (5. ábra). Az imágó egy nap alatt ivaréretté válik, és egy hónapig is élhet. Ennyi idő alatt a nőstény körülbelül 1000-1500 petét is lerakhat. A kifejlett egyed 2 mm hosszú, a teste barna színű, a szárnya szabályos. A szemei pirosak, és körülbelül 1000 facettából állnak. A kifejlett egyed teste fejből, torból és potrohából áll. A fejen három ízű álló antenna és nyalogató szájszerv található. A fejet és a testet egyaránt szőrök és serték borítják. A tor rész három ízűből áll, amiket a végtagok és a szárnyak által különíthetünk el (Szabad, 2016).



5. ábra: *Drosophila melanogaster* életsiklusa (Internet10)

A *Drosophila melanogaster* kiválóan alkalmas genetikai mozaikok létrehozására. Genetikai mozaikoknak nevezzük azokat az élőlényeket, melyek testét különböző genotípusú vagy fenotípusú sejtek alkotják. A genetikai mozaikosság kétféle lehet, azaz valódi genetikai mozaik és funkcionális mozaik. A valódi genetikai mozaikoknak két típusa van, a mennyiségi és a minőségi mozaikok.

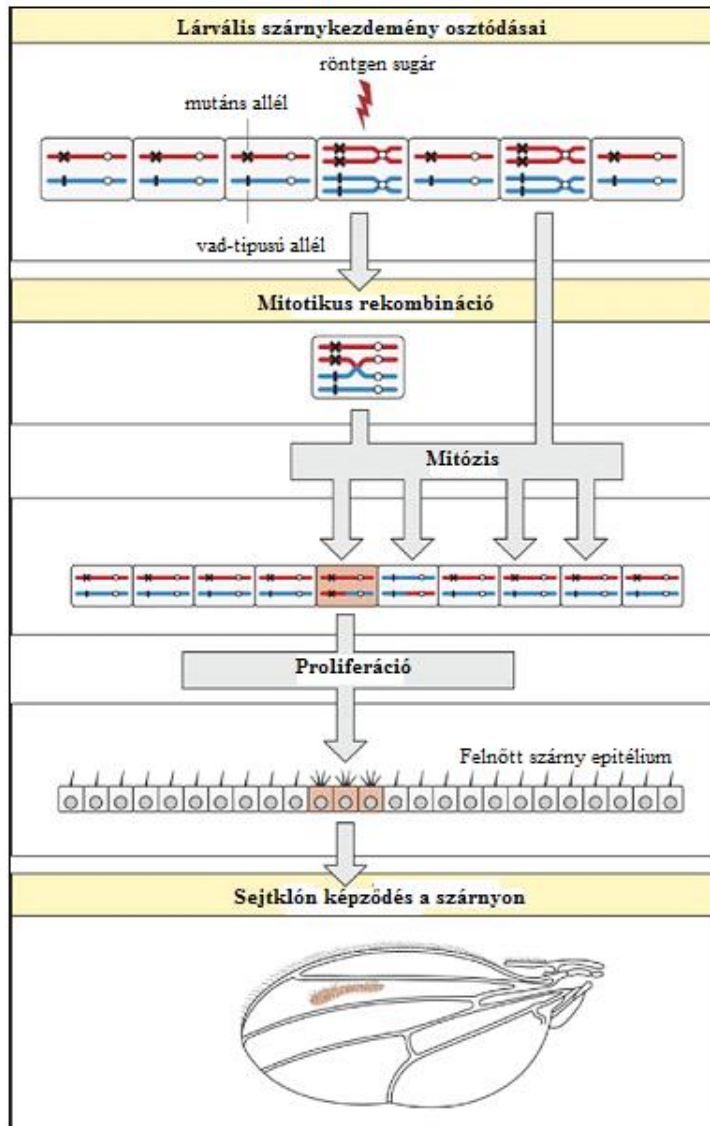
A mennyiségi valódi genetikai mozaikok képződését a genetikai non-diszjunkció vagy kromoszómavesztés okozhatja. Tehát a mennyiségi mozaikok olyan élőlények, amelyek testi sejtjeiben eltérő kromoszóma számmal találkozunk. A *Drosophilában* így XX/XO mozaikok jöhetnek létre, melyek nőstény/hím mozaikok, más néven gűnanderek. Testük egyik felét női, másik felét hím sejtek alkotják.

A minőségi valódi genetikai mozaikok képződését pont mutáció vagy mitotikus rekombináció okozhatja. Itt a sejtek kromoszóma száma azonos, de a kromoszómatörések és pontmutációk fenotípusbeli különbségekhez vezethetnek. A minőségi genetikai mozaikok indukálását arra is lehet használni, hogy teszteljük bizonyos hatóanyagok mutagén hatását. Ezzel a céllal fejlesztették ki a SMART (Somatic Mutation And Recombination Test) rendszert, amelyet a következő alfejezetben fogok bemutatni.

A funkcionális genetikai mozaikokban a sejtek örökítő anyagának mennyisége azonos, azaz a genotípusuk azonos. Ennek ellenére mégis kialakul mozaikosság, mivel a heterokromatinizációs különbségek miatt a gének máshogy fejeződnek ki az élőlény egyes sejtjeiben (Szabad *et al.*, 1983).

A *Drosophila melanogaster* SMART rendszere

Amint azt korábban említettem, az *ecetmuslica* SMART rendszere kiválóan alkalmas arra, hogy szomatikus sejtekben detektálni tudjuk azokat a génmutációkat és kromoszómatöréseket, amelyek a szárnykezdemény (imaginális diszkusz) lárvális fejlődése során következnek be, melyek tanulmányozására az imágók szárnyait használjuk. A lárvális fejlődés kezdetén, a szárnykezdemény mintegy 30-50 sejtből áll, melyek a további lárvális fejlődés során 10 órás ciklusokban növekednek és osztódnak (6. ábra).

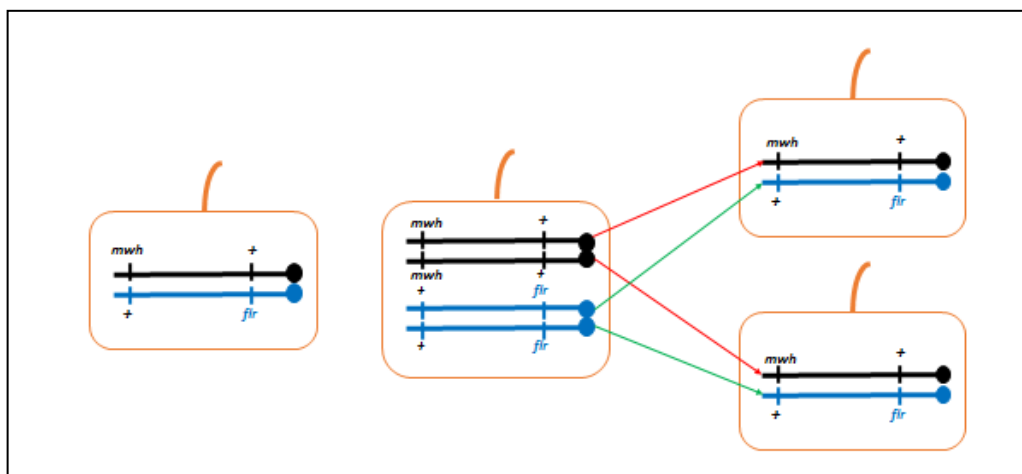


6. ábra: Mitotikus rekombináció indukciója és *mwh/mwh* klónok képződése (Internet11)

Mindezek következtében a szárnykezdeményben úgy fog exponenciálisan növekedni a sejtek száma, hogy az utolsó lárva stádium végére mintegy 50.000 sejtet fog tartalmazni. Ezt követően a báb állapot során, a szárnykezdemény szárnyra differenciálódik, amely mintegy 30.000 epiteliális sejtből áll. A véglegesen differenciálódott normális genomú szárnysejtek mindegyikéből egy hosszabb szőr nő ki. Az ecetmuslicában már irtak le olyan mutációkat, amelyek befolyásolják ezt a normális szárnysejtre jellemző szörképletet. Ilyen például a “*multiple wing hair*” – *mwh* , amely számos rövid bokor szerű szörképletet, és a “*flair*” – *flr*, amely egy rövidebb horog alakú szőrt eredményez. Vegyünk példaként egy heterozigóta *mwh* (*mwh/+*) muslica lárvét. Ennek a lárvának a szárnykezdeményében lévő szomatikus sejtek mitotikusan osztódnak és újabb, a szülői

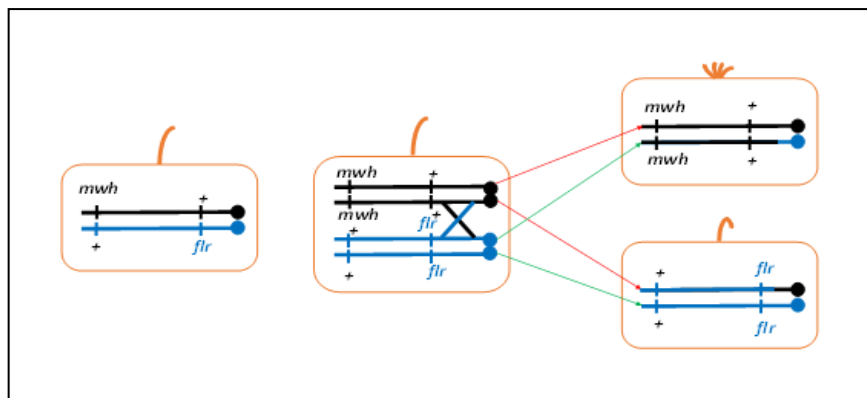
genotípussal azonos, *mwh*/+ utódsejteket eredményeznek. Amennyiben a szárnysejtek valamelyikében spontán avagy indukált mitotikus rekombináció történik, úgy az *mwh*/+ genotípusú anyasejtekből *mwh/mwh* és +/+ genotípusú utódsejtek keletkeznek. A +/+ utódsejt nem fog különbözni fenotípusban az *mwh*/+ anyasejttől mivel az *mwh* egy recesszív marker mutáció. Másfelől, az *mwh/mwh* utódsejt, az *mwh* fenotípust fogja mutatni a jellegzetes bokorszerű és rövidebb szőrökkel és további osztódásai révén egy *mwh/mwh* fenotípust mutató sejtklón lesz megfigyelhető a szárnyon (6. ábra).

Fontos hangsúlyozni, hogy nem csak a mitotikus rekombináció során lehet az *mwh*/+ anyasejtnek *mwh/mwh* utódja, hanem az anyasejtben lévő normális *mwh* allélban (+) bekövetkező mutáció is eredményezhet *mwh/mwh* utódot. Annak érdekében, hogy különbséget tudjunk tenni a kromoszómatorés indukálta mitotikus rekombináció és a génmutáció okozta *mwh/mwh* utódok között, a kísérleti rendszer tovább fejleszhető az *flr* recesszív marker mutáció alkalmazásával. Fontos kiemelni, hogy úgy az *mwh* mint az *flr* lokuszok a muslica azonos kromoszómáján helyezkednek el, azonban a tesztrendszerben, a recesszív mutáns alléljaik eltérő homológ kromoszómákon találhatóak, és ilyenképpen az anyasejt kettős transzheterozigóta genotípusú (*mwh*, +/+, *flr*) lesz (7. ábra). A sejtciklus S-fázisát követően, a homológ kromoszómapár monokromatidás tagjai bikromatidások lesznek és később a mitózis során, a homológ kromoszómapár bikromatidás kromoszómáinak kromatidái egyenlő mértékben oszlanak meg a két utódsejt között. Ilyenformán az utódsejtek genotípusa és fenotípusa teljesen megegyezik az anyasejtével.



7. ábra. Az *mwh*, + és +, *flr* homológ kromoszómapár normális mitotikus szegregációja. A homológ kromoszómapár tagjait fekete és kék színekkel jelöltem, és megfigyelhető, hogy minden szárnysejt szőrképlete normális (saját ábra).

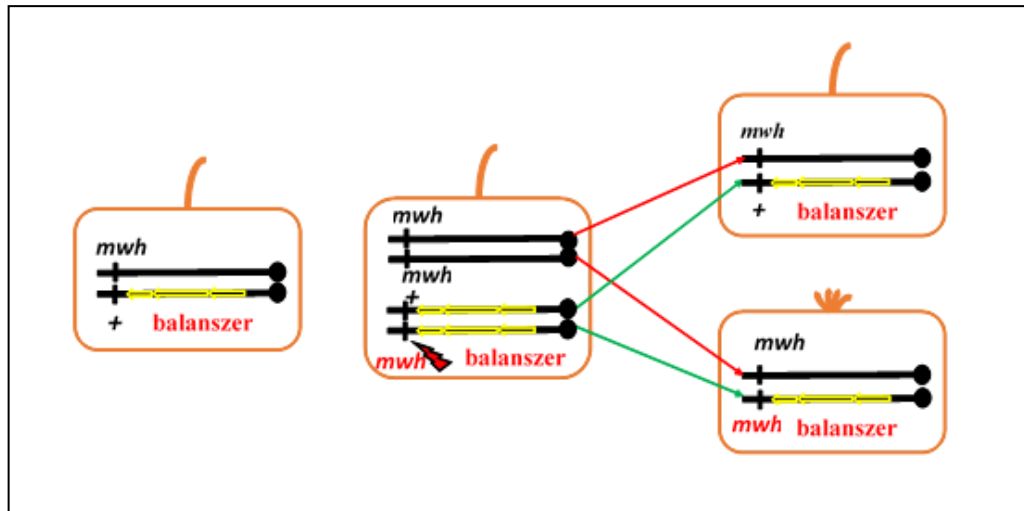
Az S-fázist követően és a mutagén hatás közepette, a bikromatidás homológ kromoszóma egyik kromatidája eltörhet és ez pedig a másik homológ kromoszóma kromatidájának a törését okozza. Kimutatták, hogy interfázisban a homológ kromoszómapár tagjai egymás közelében helyezkednek el a szomatikus sejtmagban, és ezt a jelenséget mint szomatikus párosodás írták le *Drosophilában* és emlős sejtekben (Joyce *et al.*, 2016). A bikromatidás homológ kromoszómapár eltörött kromatidái között mitotikus rekombináció történik, azaz kromoszóma szakaszok cserélődnek ki egymással (8. ábra). Ilyen esetekben a mitotikus rekombinációk meghatározó többsége a centromer közeli heterokromatinban történik.



8. ábra: Mitotikus rekombináció homozigóta mutáns utódsejteket eredményez. A homológ kromoszómapár *mwh* allélt hordozó tagjait fekete, az *flr* allélt hordozó tagjait kék színnel jelöltem, és megfigyelhető, hogy a mitotikus rekombináció következtében az utódsejtek szörképlete eltérő (saját ábra).

A transzheterozigóta szomatikus kettős mutanás (*mwh*, $+/+$, *flr*) anyasejt mitotikus rekombinációját követő mitózis eltérő, de homozigóta, mutáns utódsejteket (*mwh*, $+/mwh$, $+$ és $+/flr/+$, *flr*) eredményez. Ezeknek az utódsejteknek a további osztódásai azonos mutáns fenotípusú iker vagy egyszeres sejtklónok kialakulásához vezet a többi normális fenotípusú sejtek között. Ezek az iker sejtklónok könnyen észrevehetőek az imágók szárnyait tanulmányozva és mindenképpen a kromoszómatörésekre utalnak.

Tapasztalva azt, hogy az inverziók jelentősen lecsökkentik az iker klónok gyakoriságát a nőstényekben, azt javasolták, hogy a kísérleti rendszer továbbfejlesztése kapcsán építsék be az ún. balanszer kromoszómákat (9. ábra).

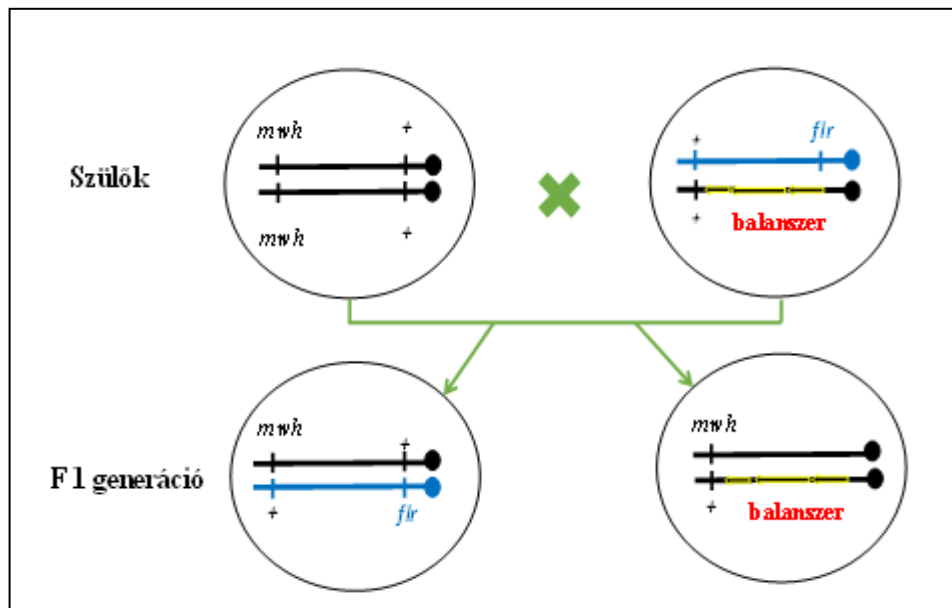


9. ábra: Balanser kromoszómás SMART rendszer. A fekete kromoszómán lévő sárga szakaszok inverziókat jelölnek a balanser kromoszómán. A (+) jel a normális *mwh* allélt jelenti, az újonnan indukált mutáns *mwh* allél pirossal jelölt (saját ábra).

A balanser kromoszómák több inverziót hordoznak, ezáltal a homológ kromoszómák párosodását megakadályozzák úgy a meiózis, mint a mitózis során, gátolva ezzel a genetikai rekombinációt. A kísérleti rendszeremben a *TM2* balanser kromoszómát használtam, amely tartalmazza az *mwh* gén normális (+) allélját. Ez a balanser nem tud párosodni a homológ kromoszómá pár másik, *mwh* mutáns allélját tartalmazó kromoszóma tagjával, így tehát nem játszódhat le mitotikus rekombináció. Azonban a *TM2* balanser kromoszómán lévő normális *mwh* allél pontmutáció révén átalakulhat recesszív *mwh* mutáns alléllá. Az újonnan indukálódott *mwh* mutációt hordozó balanser kromoszómás és a mutáns *mwh* allélt hordozó másik homológ kromoszómás utódsejtekben az *mwh* recesszív mutáció homozigóta állapotba kerül. Ezek a sejtek mutatják a specifikus bokorszerű rövidebb szőrkepletet, osztódásaik során egyszeres sejtklón keletkezik, amelyekben a sejtek mutatni fogják az *mwh* mutáns fenotípust, ami természetesen könnyen felismerhető a többi normális *mwh* fenotípusú szárnysejt között. Ilyen értelemben a balanszeres SMART rendszer alkalmas lehet a pontmutációk detektálására, de nem használható a kromozómatörések indukálta mitotikus rekombináció kimutatására.

Adódik tehát a kérdés, hogy lehetne-e egy olyan SMART rendszert kifejleszteni, amely egyszeriben képes detektálni a mitotikus rekombinációt és génmutációkat? Abban az esetben, amennyiben *mwh*, *+/mwh*, + nőstényeket keresztezünk +, *flr/TM2*, +, + hímekkel akkor kétféle genotípusú F1 utódokat kell kapnunk (10. ábra). Az *mwh*, *+/+*, *flr*

F1 utódok alkalmasak lesznek a kromoszómatörések indukálta mitotikus rekombináció és iker sejtklónok detektálására a szárnyakon. Az *mwh*,+/TM2,+,+ F1 utódok pedig az *mwh* lokuszt érintő génmutációk detektálását teszik lehetővé. Az említett kétféle mutációs esemény bekövetkeztének gyakoriságát akkor is lehet tanulmányozni, amennyiben a fenti keresztezésből származó F1 lárvákat különféle szintetikus vagy éppen természetes hatóanyagokkal kezeljük.



10. ábra. SMART rendszer mitotikus rekombináció és génmutációk detektálására. A kék és fekete kromoszómák a muslica harmadik homológ kromoszómapárjának tagjai. A fekete kromoszómán lévő sárga szakaszok inverziókat jelölnek a balanszer kromoszómán. A (+) jel a normális *mwh* és *flr* allélokat jelöli.

Tekintettel arra, hogy minden mutáció egyetlen sejtől származtatható, Szabad és munkatársai (1983) azt javasolták, hogy a kromoszómatörések (mitotikus rekombináció) gyakorisága (f) az alábbi képlet alapján számítható ki: $f = (n \times m) / (N \times C)$, amelyben n a sejtklónok száma, m az átlagos sejtklont alkotó sejtek száma, N a vizsgált szárnyak száma és C az imágók szárnyát alkotó összsejtszám (30.000 sejt/szárny). Számos vegyi anyag mutagén hatását tesztelték a fent említett SMART rendszerrel és az f érték alapján következtettek a mutagén hatás erősségére. A kolchicin esetében alacsonyabb, míg az EMS (etil-metán-szulfonát) esetében magasabb f értékeket kaptak a kontrollokhoz viszonyítva (4. táblázat).

4. táblázat: Sejtklónok indukciójának gyakorisága a transzheterozigóta *mwh*, *+/+*, *flr* muslicák szárnyai esetében. EMS (etil-metán-szulfonát).

Keze- lés	Szárny (N)	Sejtklón			Sejtklónok gyakorisága (n/N)	Sejt- klónok átlagos mérete sejtszám /klón (m)	Sejtklónok indukció- jának gyakorisága (f=nm/NC)	Referencia	
		iker	magányos						összes sejtklón száma (n)
			<i>mwh</i>	<i>flr</i>					
Kont- roll	40	1	30	1	32	0,8	1,2±0,8	3,2 x 10 ⁻⁵	Szabad és Bryant, 1982
Kol- chicin	40	2	25	0	27	0,7	3,4± 1,7	7,5 x 10 ⁻⁵	Szabad, 1986
EMS	18	38	141	17	179	10,9	7,0± 2,5	2,5 x 10 ⁻³	Szabad, 1986

Azért, hogy meg tudjuk határozni az *mwh* génben bekövetkező mutációk gyakoriságát, a fent említett képlet az alábbiak szerint módosul: $f = \frac{(2n \times m)}{(N \times C)}$, amelyben a 2n az *mwh/mwh* sejtklónok száma, m az átlagos sejtklont alkotó sejtek száma, N a vizsgált szárnyak száma és C az imágók szárnyát alkotó összsejtszám (30.000 sejt/szárny). Többféle vegyi anyag esetében sikerült megbecsülni a génmutációk indukciójának gyakoriságát és például az N,N-dinitrozo-2,6-bis-hidroximetil–piridin-bismetilkarbamát esetében alacsonyabb, míg az EMS esetében sokkal erősebb mutagén hatást tapasztaltak (5. táblázat).

5. táblázat: Sejtklónok indukciójának gyakorisága az *mwh/balanszer* muslicák szárnyain. EMS (etil-metán-szulfonát). DNPBMC (N,N-dinitrozo-2,6-bis-hidroximetil–piridin–bismetilkarbamát).

Keze- lés	Szárny (N)	Összes sejtklón száma (n)	Sejtklónok gyakorisága (n/N)	Sejtklónok átlagos mérete sejtszám/ klón (m)	Sejtklónok indukciójának gyakorisága (f=2nm/NC)	Referencia
Kont- roll	116	9	0.08	2,7 ± 1,4	1,4 x 10 ⁻⁵	Surján <i>et al.</i> , 1985
DNPB MC	38	14	0.4	2,4 ± 1,4	5,9 x 10 ⁻⁵	Surján <i>et al.</i> , 1985
EMS	12	44	3.7	7,4 ± 3,2	1,8 x 10 ⁻³	Szabad, 1986

A 4-5. táblázatban feltüntetett eredmények arra engednek következtetni, hogy a mitotikus rekombinációk és génmutációk alacsony gyakorisággal a kezeletlen kontrollok esetében is bekövetkeznek. A kapott 10⁻⁵ értékek megfelelnek a muslicára jellemző spontán mutációs rátának.

Mollet és Würgler (1974) javasolták a mutagén hatás tanulmányozását *Drosophila* szomatikus sejteken, és az azóta eltelt években, a SMART rendszer bizonyította alkalmasságát demonstrálva a mutagén és karcinogén, illetve a mutagén és rekombinogén hatások közötti összefüggéseket számos vegyi hatóanyag esetében (Vogel, 1980; Vogel *et al.*, 1983; Saturnino *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2016; Morais de *et al.*, 2016; Soares Neto *et al.*, 2016). A SMART rendszernek számos előnye van, mint például (1) a kezelés után a legyek korlátlan ideig biztonságosan tárolhatók 70%-os etanol oldatban; (2) a tartós szárnypreparátumok bármikor megvizsgálhatók; (3) tekintettel a szárnyat alkotó nagyszámú sejtre egyszerre több ezer sejtet teszünk ki a mutagének hatásának. Tekintettel a *Drosophila melanogaster* SMART rendszerének sajátosságaira és előnyeire úgy döntöttem, hogy alkalmazni fogom az articsóka és a görögszéna kivonatok feltételezett genotoxicitásának tesztelésére is. Azonban mielőtt rátérnék a genotoxicitás vizsgálatokra mindenképpen tanulmányozni kell, hogy a kérdéses növényi extraktumok befolyásolják-e koncentráció-, illetve időtartam-függően a muslica életképességét és életidejét. E tekintetben az ecetmuslica újfent bizonyította alkalmasságát, hiszen például a zöld tea esetében az élethossz növekedését (Lopez *et al.*, 2016a) tapasztalták, míg egy másik kísérletben 10 mg/ml zöld tea polifenol tartalmú extraktum csökkentette a muslicák viabilitását (Lopez *et al.*, 2016b). A *Curcuma longa* (kurkuma) és az *Emblica officinalis* (amla, indiai egres) vagy a kurkuma alapú kezelések növelték a muslicák élettartamát (Rawal *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2010).

2.4.3. A növényi extraktumok citotoxicitásának elemzése humán sejtvonalakon

2.4.3.1. Az MTT citotoxicitási teszt

A citotoxikus hatás tanulmányozása kapcsán leginkább célravezető a humán sejttenyészetek alkalmazása. A humán sejtvonalak többsége immortalizált rákos sejteket tartalmaz, amelyeket *in vitro* körülmények között tartunk fent, így aztán érthető, hogy a velük kapcsolatos kísérleti eredmények is elsősorban az adott sejt típusra érvényesek és nem általánosíthatunk az egész emberi szervezetre vonatkozóan. Figyelembe szükséges venni, hogy a jelenlegi módszerekkel tenyésztett sejtek esetében nem érvényesülnek a humán szervezet egyed szintű integrációjáért felelős neuro-hormonális szabályozások. Mindezek ellenére, a sejttenyészetes kísérletekkel viszonylag gyorsan lehet információkat gyűjteni arra vonatkozóan, hogy az extraktumok miként befolyásolják a kezelt sejtek viabilitását.

A tenyésztett sejtek proliferációját az MTT (dimethylthiazol-diphenyl-tetrazolium-bromide) teszttel szokták vizsgálni, amely valójában egy indirekt módszer az élő sejtszám megbecslésére és a sejtpopuláció metabolikus aktivitásának meghatározására (Mosmann, 1983). A módszer lényege, hogy a sejttényészetekhez hozzáadott sárga színű MTT oldat (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, tetrazole) redukálódik bordó színű formazánná az élő sejt mitokondriumaiban. A formazán oldhatatlan kristályok formájában keletkezik, mely egy szolubilizáló oldat segítségével képes feloldódni. A feloldott formazán mennyiségének megfelelően világosabb vagy sötétebb bordó oldat képződik. Mivel a reakciót egy mitokondriális enzim (oxido-reduktáz) végzi, mely csak az élő sejtekben aktív, így a reakció eredménye szorosan összefügg az élő sejtek számával. A formazán mennyiségéből következtetünk az élő sejtek számára. A spektrofotométer segítségével 500-600 nm hullámhosszon ezen oldatok abszorpciója mérhető. A fényabszorpció és az élő sejtek száma között egyenes arányosság van, azaz minél nagyobb a fényelnyelés érték, annál nagyobb az életképes sejtek száma (van der Woude *et al.*, 2003).

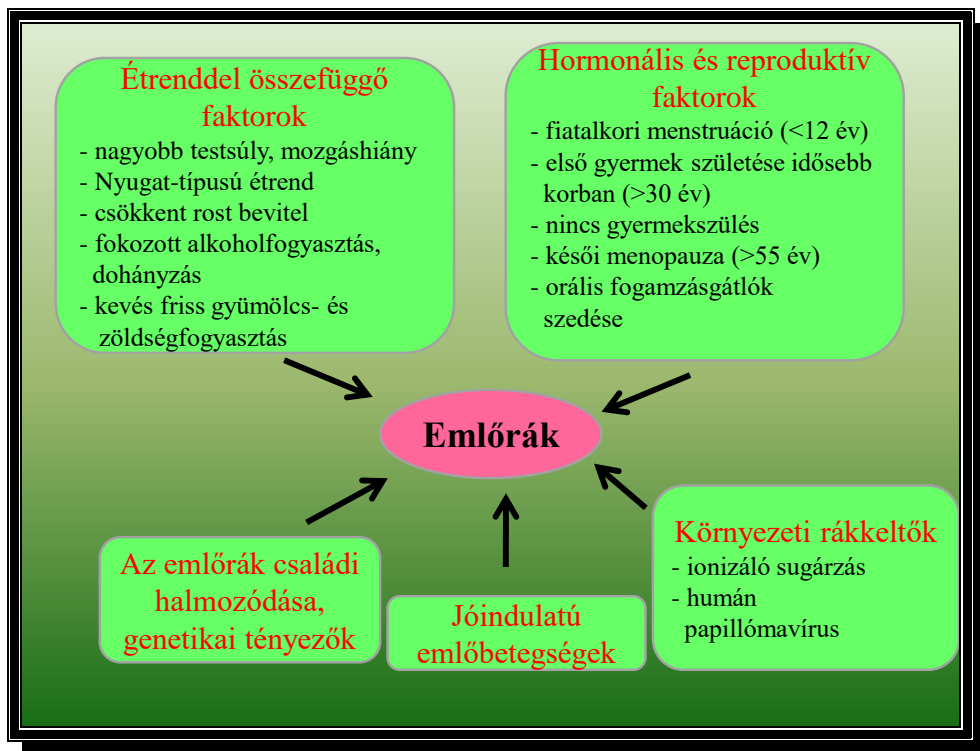
2.4.3.2. Az immunhisztokémia

A tenyészetben lévő sejtek állapotáról további információkat lehet nyerni, amennyiben fixáljuk őket, majd immunhisztokémiai vizsgálatot végzünk. Az immunhisztokémia olyan eljárás, amely során a szöveti/sejti struktúrákat, sejtfelszíni és leginkább intracelluláris struktúrákat azonosítunk specifikus ellenanyagok (antitestek) felhasználásával. A szövetek és sejtek strukturális elemeihez (antigén) kötődött elsődleges ellenanyagokhoz újabb ún. másodlagos ellenanyagok kötődnek, amelyek kromogén molekulákat tartalmaznak. Ezek a kromogén molekulák valójában fluoreszcens vegyületek, és nagyenergiájú (kis hullámhosszú) fényvel megvilágítva más, alacsonyabb frekvenciájú fényt bocsátanak ki. Ez utóbbi viszonylag könnyen detektálható a fluoreszcens mikroszkópok segítségével. Különböző fluoreszcens molekulák léteznek, melyekkel akár egyidejűleg többféle sejtsejtszervecske vagy molekula jeleníthető meg. Mivel a fluoreszcencia során kibocsátott fény hullámhossza (színe) eltér a megvilágító fénytől, a fluoreszcens mikroszkóppal alkotott kép általában csak a vizsgálni kívánt (megfestett) rész látható. Ez a nagy specifikusság a fluoreszcens mikroszkópia széles elterjedéséhez vezetett a sejt kultúrákkal végzett kutatásokban is. Kutatásaim során arra használtam az immunhisztokémiát, hogy további információkat kapjak a növényi

extraktumokkal kezelt sejtekben végbemenő jelenségekről, és ezek alapján következtetni tudnak az extraktumok hatásmechanizmusára.

2.5. A növényi eredetű bioaktív hatóanyagok alkalmazási lehetőségei az emlőrák prevenciója/terápiája során

Az emlőrák előfordulásának kockázata az életkor előrehaladtával nő, az összes emlődaganat több mint 80%-át 50 éves kor felett diagnosztizálják. Az emlőrák kialakulásában számos tényező játszhat szerepet, amelyek lehetnek táplálkozási faktorok, örökletes hajlam, az emlőben kialakult jóindulatú megbetegedések, külső rákkeltő hatások és hormonális egyensúlyzavar (11. ábra), (Tompá, 2011; Tompa 2012).



11. ábra: Az emlődaganat kialakulását befolyásoló faktorok

Patológiai vizsgálatok során megállapították, hogy az emlőtumorsejtek több mint 70%-ában ösztrogén- és/vagy progesteron receptor mutatható ki. Az ilyen daganat típusokat hormonálisan érzékeny daganatoknak nevezzük (Brown *et al.*, 2008). A betegek a gyógykezelések bizonyos szakaszaiban hormonális hatásmechanizmusú készítményeket (endokrin készítmények) kaphatnak. A súlyos tünetekkel járó kemoterápiás kezelésekkel szemben, az endokrin készítmények szájon át történő alkalmazása, enyhébb mellékhatásokkal jár, viszont pozitív hatásuk lassabban jelentkezik. Az éveken át tartó terápia akkor befolyásolhatja jelentősen a páciensek életminőségét ha megfelelő

mennyiségben és a kezelés teljes időszakában szedik ezen készítményeket (Owusu *et al.*, 2008; Rubovszky és Horváth, 2011).

Megfogalmazhatók olyan kérdések, hogy vajon a preventív és/vagy terápiás táplálkozással megelőzhető-e a rákos betegség vagy esetleg növelhető-e a terápiás eljárás hatékonysága? E kérdésekre keresve a válaszokat, eljutunk olyan növényi eredetű bioaktív hatóanyagokhoz, amelyek *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok által bizonyítottan kifejtik jótékony hatásukat. Az indiai sáfrányként is emlegetett aranysárga fűszernövény, a kurkuma (*Curcuma longa*), az utóbbi évek legkedveltebb gyulladáscsökkentő, baktériumellenes és daganatmegelőző hatású fűszerévé lépett elő (Gupta, 2017; Hallman *et al.*, 2017). A kurkuma a kurkumint 2-5%-ban tartalmazza, zsírban oldódik jól, ezért zsírt tartalmazó ételek fogyasztásával egyidejűleg hatásos bevinni a szervezetbe. Antioxidáns hatása nem tekinthető jelentősnek. A rák- és gyulladásellenes hatását az *NF-kappaB* gátlásával fejtí ki, amely számos olyan gén (*COX-2*, *LOX*, *TNF-alfa*) szabályozásáért, termelődéséért felel, melyek gyulladástörnak tekinthetők (Shehzad *et al.*, 2013a). A kurkumin gátolja továbbá az omega-6 zsírsavakból képződő gyulladáskeltő prostaglandinok, leukotrének és a vérrögök kialakulásáért felelős tromboxán termelődését is, javítva a szív- és érrendszeri megbetegedés kialakulását (Shehzad *et al.*, 2013b). A kurkumin rákellenes hatását számos ráktípuson vizsgálták és megállapították, hogy számos olyan folyamatot szabályoz, amely a rákos sejtek kialakulásával, osztódásával és a programozott sejthalállal áll kapcsolatban. Többek között gátolja az AP-1 (Aktiváló fehérje) működését, serkenti a *p16* és *p53* tumorszupresszor gének aktivitását, valamint serkenti az autofágiát (Wilken *et al.*, 2011; Hallman *et al.*, 2017). Mellrák elleni hatásvizsgálatoknál igazolták, hogy a rákos sejtek szaporodás gátlásának mértéke függ a kurkumin alkalmazás idejétől és dózisától, ugyanakkor a sejtpusztulás mind a hormonfüggő, mind az attól független sejtvonalak esetében is megfigyelhető volt (Mehta *et al.*, 1997). A kurkumin kiemelkedő hatékonysága, de rossz felszívódásának és hasznosulásának tükrében vizsgálatok során megállapították, hogy a kurkumin piperinnel (feketebors kivonat) való kombinációjával szignifikánsan nagyobb hasznosulás érhető el a dietil-nitrózamin által indukált hepatocelluláris karcinoma sejtekkel történő kezelések során (Patial *et al.*, 2015). A dietil-nitrózamin (DEN, (C₂H₅)₂NNO) tumor-iniciációs hatása azon alapul, hogy oxidációjának végtermékeként aktív alkil-gyök szabadul fel, amely a DNS valamely bázisához kötődve adduktot képez, így mutációkat okoz (Baghy, 2011).

Az artemisinin az egynyári üröm (*Artemisia annua*) fő hatóanyaga, melyet a kínai orvoslásban a malária gyógyítására használtak régebben. Hatásának alapja, hogy apoptózist indukál minden kiemelkedően magas vastartalmú sejtben, és a maláriával fertőzött sejtek lényegesen magasabb vastartalommal bírnak, mint az egészséges sejtek. Bizonyított tény, hogy az artemisin citotoxikussá válik vas jelenlétében. A rákos sejtek vasfelvétele jóval nagyobb a normál sejtekhez képest, ha holotranszferrinnel (vaskötő molekula) kezelik azokat. A mellrák sejtjeinek felszínén 5-15-ször több transferrin receptor van, mint a normál emlő sejteken. Egy tanulmányban a mellrákos sejteket és a normál sejteket is kezelték artemisinnel. Az eredmények azt mutatták, hogy az artemisinin megölte a sugárzásrezisztens emlő rákos sejteket is, ugyanakkor a hatás az egészséges sejtekben minimális volt (Singh és Lai, 2001).

A gyömbér régóta ismert gyomornyugtató és gyulladáscsökkentő hatása mellett napjainkban ígéretes hatásai is megmutatkoznak a rákos megbetegedések kezelésében. A gyömbér gyökere olyan fenolos bioaktív komponensekben gazdag, mint a [6]-gingerol, a [8]-gingerol és a [10]-gingerol. Kutatások során megállapították, hogy az említett három összetevő képes gátolni az emlőrákos sejtek növekedését, mind egér, mind a humán kísérletek esetében is. A legjobb gátló hatást a [8]-gingerol és a [10]-gingerol esetében tapasztálták a háromszorosan negatív rákos sejteknél. Továbbá megállapították, hogy a [10]-gingerol szupresszálja az ösztrogén receptor hordozó (MCF-7, T-47D), valamint a HER2 overexpresszált (SKBR3) emlőrákos sejtek növekedését. Az MDA-MB-231 sejteken végzett vizsgálatoknál a [10]-gingerol az S-fázisban megállította a sejtosztódást, valamint apoptózist indukált és felszabadította a proapoptotikus mitokondriális citokróm-C-t és a SMAC/DIABLO fehérjét a citoplazmába (Bernard *et al.*, 2017). Egy másik tanulmányban a gyömbér nyers kivonatának mellráksejtekre kifejtett hatását vizsgálták. A kísérlet során tapasztalt többféle hatásmechanizmus annak volt köszönhető, hogy nem izolált hatóanyagokat alkalmaztak az egyes kezeléseknél, hanem egy koplett gyömbérvivonatot, amelyben a gyömbér összetevőinek teljes hatása kifejeződhetett. A gyömbér sokoldalú daganatellenes hatásai során aktiválja a rákos sejtek apoptózisát, gyengíti a rák növekedését elősegítő géneket és proteineket, mialatt olyan géneket aktivál, amelyek a daganat kifejlődését gátolják. A kutatás során arra is fény derült, hogy a kivonat az egészséges emlősejtek növekedését és osztódását nem befolyásolja hátrányosan (Elkady *et al.*, 2012).

A chili paprika (erős paprika) (*Capsicum annuum*) fő hatóanyaga a csípősségért felelős kapszaicin. Tanulmányok sora igazolta, hogy mind a friss, mind a szárított paprika

kivonatok kiemelkedően hatékonyak a rákos sejtek elpusztításában, valamint gátolják azok szaporodását. *In vitro* körülmények között tenyésztett háromszorosan negatív (triple negative) mellráksejteken végzett kísérleteknél azt találták, hogy a kapszaicin a sejtmembránhoz kapcsolódva a TRPV1 receptor aktiválásával fejt ki jótékony hatását. Az ilyen típusú mellrák esetében hiányzik az a három receptor (ösztrogén-, progesteron- és HER2 receptor), amelynek az inaktiválásával más emlőtumoroknál pozitív eredmények érhetőek el. Jelenlegi ismeretek szerint a kapszaicin akkor a leghatékonyabb, ha azt orvosi kezelések során juttatják a páciens szervezetébe (Wu *et al.*, 2014; Weber *et al.*, 2016).

2.6. Szakmai motiváció

Élelmiszer-minőségbiztosító agrármérnökként mindig is foglalkoztatott az élelmiszerlánc egészére kiterjeszhető minőségirányítási rendszerek alkalmazási lehetőségei. Ebből kifolyólag, minden konkrét élelmiszer esetében a specifikus termékpályára kell fókuszálni, mégpedig úgy, hogy az adott élelmiszertermék kapcsán definiáljuk a fogyasztóra gyakorolt élettani hatást. A fogyasztó által elfogyasztott élelmiszertermék élettani hatásait jelentős mértékben képesek befolyásolni a növényi eredetű bioaktív hatóanyagok is.

Kísérleteimet a Nyíregyházi Egyetem (korábban Nyíregyházi Főiskola) Agrár és Molekuláris Kutató Intézetében (AMKI) kezdtem, eredményeim többségében az itt elvégzett munkámból származnak. Az AMKI kutatási koncepciója a növényi eredetű bioaktív hatóanyagok fogyasztókra gyakorolt szerepének a definiálására irányult a személyreszabott preventív- és/vagy terápiás táplálkozás összefüggéseiben. Mindez azt jelenti, hogy az alapanyagban/élelmiszertermékben lévő bioaktív hatóanyagok alapját képezhetik egy olyan újfajta minőségirányítási rendszernek, amelyben az adott élelmiszer fő hangsúlya a fogyasztó egyéni egészségi állapotára gyakorolt hatására kerül. Igaz, hogy ez a megközelítés utópisztikusan hangzik, de nem feledkezhetünk meg arról, hogy a természet-, agrár- és élettudományi kutatások terén rendkívüli intenzitással halad előre az emberiség. Így elképzelhető, hogy a jövőben lehetőség lesz arra, hogy egyéni szinten tudjuk monitorozni a makro- és mikronutriens, illetve a növényi/állati eredetű bioaktív hatóanyag szükségleteinket – az egészséges embereknél preventív, míg a krónikus betegeknek terápiás táplálkozást alkalmazva –, hogy elsősorban a funkcionális igényeinket elégítsük ki.

Kutatásom finansziális háttérét meghatározó mértékben a **„HURO/0801 Magyarország-Románia Határon Átnyúló Együtműködési Program 2007-2013”**, **„Természetes eredetű növényi hatóanyagok *in vitro* vizsgálata, különös tekintettel a potenciális tumorellenes hatásokra”** című projekt és a **Partiumi Tudáscentrum fejlesztése, EGT/Norvég Finanszírozási Mechanizmus, EA-_NORVÉGALAP-BIOBEL09** kutatási program adta, melyekben Dr. Máthé Endre irányításával aktívan közreműködtem. Ezekben a projektekből 14 növényi faj több mint negyvenféle extraktumát vizsgáltam. A doktori disszertációmban csak az articsóka- és görögszéna extraktumokkal kapcsolatos eredmények kerülnek bemutatásra.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám célja olyan új növényi extraktumok kifejlesztése volt, amelyek potenciálisan antitumor hatással rendelkeznek. Céлом volt a kivonatok nagyműszeres analitikai módszerekkel (UHPLC-ESI-MS; UV-VIS spektrofotométer) történő szerkezetvizsgálata. A potenciális antitumor hatások közül elsőként az extraktumok humán emlőtumorsejtekre (T-47D, ZR-75-1) gyakorolt *in vitro* osztódásgátló hatását kívántam vizsgálni, továbbá a potens származékok hatásmechanizmusának felderítését is terveztem.

Vizsgálataim során az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

1. Milyen bioaktív hatóanyag-tartalommal rendelkeznek a vizes- és alkoholos articsóka, illetve görögszéna kivonatok?
2. Milyen hasonlóságok és különbségek vannak az articsóka- és görögszéna extraktumok között a bioaktív hatóanyag-tartalmat illetően?
3. Milyen élettani hatásokra lehet következtetni az articsóka- és görögszéna extraktumok bioaktív hatóanyag-tartalma alapján?
4. Milyen összpolicifenol-, összflavonoid-, összzantocianin-tartalommal, illetve *in vitro* antioxidáns kapacitással rendelkeznek az articsóka- és görögszéna extraktumok?
5. Miként befolyásolja a vizes- és alkoholos articsóka, illetve görögszéna kivonat a T-47D és a ZR-75-1 humán emlőkarcinóma sejtek életképességét?
6. Befolyásolják-e az articsóka- és görögszéna extraktumok a *Drosophila melanogaster* életképességét, illetve van-e bizonyítható citotoxikus és/vagy genotoxikus hatásuk?
7. Milyen következtetéseket lehet levonni a hatóanyag-tartalom-, valamint az *in vivo* és *in vitro* hatástani vizsgálatok alapján az articsóka- és görögszéna extraktumok humán vonatkozású alkalmazásait illetően?

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. A növényi extraktumok készítése

Az *in vitro* és *in vivo* vizsgálataimhoz kétféle extraktumot készítettem szárított articsóka levél (*Cynara scolymus* L.; MDR 2000 Kft., Gödöllő) és görögszénamag (*Trigonella foenum-graecum* L.; TRIGONELLA MED. Kft., Mosonmagyaróvár) felhasználásával. Az extraktumok készítésekkor vizes és alkoholos kivonatokat hoztam létre. A vizes kivonat esetében 5 g alapanyagot 100 ml desztillált vízben 5 percig forraltam. Az így elkészített oldatot szobahőmérsékleten hagytam lehűlni, majd centrifugálás (10 perc, 4000 rpm) után redős szűrőn átszűrtem. Az alkoholos kivonat készítésekor a szárított articsóka levelet kétszer négy órán át rázógépen rázattam 40 °C-os hőmérsékleten. (10 g + 500 ml 50 %-os etanol (Sigma Aldrich). Rázás után az így kapott oldatokat egyesítettem, centrifugáltam (10 perc, 4000 rpm), redős szűrőn átszűrtem és rotációs vákuumbepárló segítségével oldószermentesítettem a kivonatokat. A görögszéna esetében az alkoholos extrahálás során 5 g őrölt magot 100 ml 80 %-os etanollal refluxoltam három órán át. Az oldatot szobahőmérsékletűre hagytam lehűlni, centrifugáltam, redős szűrőn átszűrtem és rotációs vákuumbepárló segítségével elvégeztem az oldószermentesítést. Az így előállított, szárított articsókalevél és görögszénamag extraktumokat a különböző vizsgálatokig 4°C-os hűtőben, illetve fagyasztószekrényben tároltam.

4.2. A növényi extraktumok UHPLC-ESI-MS vizsgálata

A HPLC-MS/MS technika napjaink egyik legnépszerűbb műszere az analitika tudományterületén belül, mely nagyfokú szenzitivitása és szelektivitása révén az utóbbi évtized első számú módszerének tekinthető a femtogramm anyagmennyiségek komplex mátrixokban történő meghatározásában. A folyadékkromatográfia és a tömegspektrometria összekapcsolásának megoldásáért, az elektropray ionizáció kifejlesztéséért 2002-ben John B. Fenn-t Nobel-díjjal tüntették ki. A módszer során a folyékony halmazállapotú mintát az oldószerrel együtt először el kell párologtatni és csak a gázfázisba került töltött részecskéket, a pozitív vagy negatív töltésű ionokat lehet a nagy vákuum alatt működő analizátorba juttatni. A mérés során az ionforrásban a molekulák nem fragmentálódnak (lágyszó ionizáció), tehát az ionok pszeudo-molekulaionként jelennek meg a tömegspektrumban. Pozitív ionizáció esetén leggyakrabban $[M+H]^+$, negatív

ionizáció esetén $[M-H]^-$, vagyis a semleges molekulatömeghez képest mindig egy egységgel arrább kell keresni a molekulaiont. Ezért a készüléken belül egy ütközési cellában kell létrehozni a fragmens-ionokat, kis nyomású gázzal való ütköztetéssel. Az ionok szétválasztása tömeg/töltés (m/z) szerint történik.

Méréseim során a folyadékkromatográfiás vizsgálatokhoz Dionex Ultimate 3000RS készüléket használtam, Thermo Accucore C18 oszloppal (kolonnával) felszerelve (100/2,1 X 2,6 μ m), mely egy fűthető elektrospray ionizációs (HESI) rendszerrel ellátott Thermo Q Exacutive Orbitrap tömegspektrométerhez kapcsolódik. Mozgófázis a pozitív töltésű ionizációs módban a következő volt: „A” eluens (500 ml víz, mely tartalmaz 10 ml acetonitrilt, 0,5 ml hangyasavat és 2,5 mM (158 mg) ammonium formiátot); „B” eluens (500 ml acetonitril, mely tartalmaz 10 ml vizet, 0,5 ml hangyasavat és 2,5 mM (158 mg) ammonium formiátot), míg a mozgófázis a negatív töltésű módban: „A” eluens (500 ml víz mely tartalmaz 10 ml acetonitrilt és 2.5 mM (192,7 mg) ammónium acetátot); „B” eluens (500 ml acetonitril, mely tartalmaz 10 ml vizet és 2,5 mM (192,7 mg) ammónium acetátot). Az áramlási sebesség 200 μ l/perc volt. A következő gradiens elúciót használtam mind a pozitív, mind a negatív ionizációs módban: 0-1 perc 95%A, 1-22 perc 20%A, 22-24 perc 20%A, 24-26 perc 95%A, 26-40 perc 95%A. Minden mintából 5 μ l-t injektáltam. A tömegspektrométert a következő beállításokkal működtettem: 320 °C-os kapilláris hőmérsékelt; kapilláris feszültség pozitív módban 4,0 kV, negatív módban 3.8 kV; a felbontás MS módban 35000 volt, míg MS/MS esetében 17500. A mért tömegtartomány 100-1000 m/z volt, a többszörös töltésű ionok kizárásra kerültek. Az ütközési energia 40NCE volt az MS/MS módban.

4.3. A növényi extraktumok spektrofotometriai vizsgálata

4.3.1. Az összpolicenol-tartalom meghatározás

A meghatározás alapja az, hogy a Folin-Ciocalteu reagensben lévő sárga színű Mo(VI) ionok az antioxidánsok hatására kék színű Mo(V)-té redukálódnak (Singleton *et al.*, 1965). A módszerhez galluszsav sztenderdet használtam. Először a méréshez elkészítettem egy 15 g/100 ml koncentrációjú Na₂CO₃-oldatot. A sztenderdként használt galluszsavból, az alábbi koncentrációjú oldatokat készítettem: 50 μ g/ml; 100 μ g/ml; 300 μ g/ml; 500 μ g/ml; 750 μ g/ml. Az oldószer desztillált víz volt. A mérendő mintákat (extraktumokat) úgy hígítottam, hogy az abszorbancia értékük a galluszsav-oldatok kalibrációs tartományába essen. A mérendő kivonatok előkészítése során 0,2 ml mintához

(vak, standard) 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagenst, 2 ml Na₂CO₃-oldatot és 3 ml desztillált vizet pipettáztam. Az összemért elegyeket 20 percig állni hagytam szobahőmérsékleten, majd desztillált vízzel 10 ml-re hígítottam és 1 órán át szintén szobahőmérsékleten sötétben inkubáltam. A fotometriás analízis előtt minden mintát 0,45 µm-es szűrőn átszűrtem, majd 765 nm hullámhosszúságon lemértem. Az eredményeket mg/g koncentráció egyenértékben fejeztem ki.

4.3.2. Az összflavonoid-tartalom meghatározás

A meghatározás azon alapul, hogy a flavon és a flavonol típusú vegyületek alumínium-kloriddal savas közegben, sztöchiometrikus reakcióban egy komplexet képeznek (Kim *et al.*, 2003). A keletkező komplex színintenzitása alkalmas a vegyületek oldatban történő kvantitatív meghatározására. A spektrofotometriás mérés során rutin sztenderdet használtam. Először elkészítettem az alumínium-tartalmú reagens oldatot (továbbiakban: Al-oldat), melynek összetétele: 5 ml 10 g/ml AlCl₃-oldat, 5 ml 1 M-os KOAc-oldat (kálium-acetát-oldat), 75 ml metanol (abszolút) és 140 ml desztillált víz. A sztenderdként használt rutinból az alábbi koncentrációjú oldatokat készítettem: 10 µg/ml; 40 µg/ml; 70 µg/ml; 100 µg/ml; 143,3 µg/ml. Az oldószer desztillált víz : etanol, 1:1 arányú elegye volt. A spektrofotometriás méréskor 0,5 ml extraktumhoz 4,5 ml (vak, standard) Al-oldatot pipettáztam, majd 0,45 µm-es szűrőn átszűrtem és 415 nm hullámhosszon mértem a fényabszorpció értékét. A mérendő mintákat (extraktumokat) úgy hígítottam, hogy az abszorbancia értékük a rutin-oldatok kalibrációs tartományába essen. Az eredményeket a kalibrációs egyenesből rutin-egyenértékben adtam meg.

4.3.3. Az összantocianin-tartalom meghatározás

Az extraktumok antocianin-tartalmát pH-differenciális módszerrel határoztam meg (Lee *et al.*, 2005). Minden minta fényelnyelését 520 nm és 700 nm hullámhossz tartományban is megmértem. Az antocianin-tartalmat cianidin-3-glükozidra számítottam és az eredményt mg/l dimenzióban kaptam meg az alábbiakban ismertetett egyenlet szerint. A hígított minták abszorbancia értékeinek számítása a különböző hullámhossz tartományokon és pufferekben mért fényelnyelések alapján:

$$A=(A_{520}-A_{700})_{pH1}-(A_{520}-A_{700})_{pH4}$$

Az eredeti minta összes antocianin koncentrációjának (TA) meghatározása:

$$TA \text{ (mg/L)} = ((A * MW * DF * 1000) / \epsilon / l)$$

Ahol, A: fényelnyelés érték; MT: cianidin-3-glükózid (Chrysanthemín) molekulatömege (449,2 g/mol); DF: hígítási faktor; l: a kivetta fényútja (1cm); ϵ : 26900 (moláris extinkciós koefficiens, cianidin-3-glükózidra). A mérendő minták előkészítése során 0,3 ml mintához (vak, standard) 2 ml puffert (pH=1 vagy pH=4) és 1,7 ml desztillált vizet pipettáztam. A spektrofotometriás mérés előtt minden mintát 0,45 μ m-es szűrőn átszűrtem. A mérést 520 nm és 700 nm hullámhossz tartományban végeztem.

4.3.4. Az antioxidáns kapacitás meghatározás

A meghatározás során DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) oldatot használtam, melynek etanolos oldata intenzív ibolyaszínű, de antioxidáns (hidrogén donor) molekulák hatására ez a szín sárga színűre változik (Molyneux, 2004). A színváltozás spektrofotometriás mérés során 517 nm hullámhosszon nyomon követhető és arányos az antioxidáns vegyületek koncentrációjával. Az így kapott eredményeket az aszkorbinsav antioxidáns kapacitásával hasonlítottam össze. Aszkorbinsavból az alábbi koncentrációjú oldatokat készítettem: 30 μ g/ml; 40 μ g/ml; 50 μ g/ml; 60 μ g/ml; 70 μ g/ml. Az oldószer desztillált víz volt. A spektrofotometriás méréskor 0,2 ml extraktumhoz (vak, standard) 0,3 ml metanolt és 2,4 ml DPPH oldatot (22,6 μ g/ml koncentrációban) pipettáztam. Ezt követően a mintákat 30 percig sötétben szobahőmérsékleten inkubáltam, majd mérés előtt 0,45 μ m-es szűrőn átszűrtem. A mérendő mintákat (extraktumokat) úgy hígítottam, hogy az abszorbancia értékük az aszkorbinsav-oldatok kalibrációs tartományába essen.

4.4. A *Drosophila melanogaster* specifikus vizsgálati módszerek

4.4.1. A *Drosophila melanogaster* tenyésztése

A vad típusú és mutáns ecetmuslica törzseket normál és *Drosophila* Instant Medium (Carolina Biological Supply, Burlington, NC, USA) típusú táptalajon tenyésztettem 25°C-on. A mutáns törzsek a bloomingtoni *Drosophila* törzsközpontból származtak. A normál táptalaj literenként 60 g szacharózt, 30 g búzadarát, 21 g szárított pékélesztőt, 10 g agar-agart és 1 g nipagint tartalmazott. A vizsgálati törzsek tenyésztése fiolákban és üvegekben történt. A fiolákba 5 ml, míg az üvegekbe 50 ml normál táptalajt adtam. Ugyanakkor a *Drosophila* Instant Medium-ból a fiolákba 1 g-ot, míg az üvegekbe

10 g-ot mértem, majd a fiolákba 5 ml H₂O-t, az üvegekbe 50 ml H₂O-t mértem ki. A növényi extraktumos kezeléseket *Drosophila* Instant Medium típusú táptalajt tartalmazó fiolákban végeztem. Amint a lárvák elérték a harmadik stádiumot, a fiolákba 1 ml extraktumot mértem, majd figyeltem, miként folytatódik az egyedfejlődés.

4.4.2. A *Drosophila melanogaster* életképességi vizsgálatok

Annak érdekében, hogy megtermékenyített petéket gyűjtssek, 50 nőstény és 50 hím ecetmuslica egyedet kereszteztem petéztető csöveket használva. A petéztető cső alsó oldalán petéztető táptalajos Petri csésze található. A petéztető táptalaj csak aktív szenet és agar-agar-t tartalmaz. Az aktív szén fekete színt kölcsönöz a táptalajnak, mely által nagymértékben megkönnyíti az ecetmuslica fehér színű petéinek a megfigyelését. A petéztető táptalaj közepére egy kisebb pékésztő darabot helyeztem annak érdekében, hogy biztosítsam a megfelelő tápanyagokat a keresztezett szülői egyedek számára. A szülőket 25°C-on, 16 óráig hagytam petézni, ezt követően lecseréltem a petéztető táptalajt. A petéztető táptalajt 4 órás időközönként cseréltem, melyekről a petéztetést követően – a lerakott peték számától függően – 50 petényi csoportokat friss, normál táptalajt tartalmazó fiolákba tettem. Ezeket, az 50 petét tartalmazó fiolákat 25°C-os inkubátorban tartottam, majd a harmadik napon (96 órás lárva állapot) a fiolákba a vizsgált extraktumokból 1 ml-t mértem, és a fiolákat visszahelyeztem az inkubátorba. Ezt követően, egészen az F1 imágók megjelenéséig a fiolákat naponta megvizsgáltam, és a bábból kikelt imágókat megszámláltam. Az ecetmuslica életképességét %-os formában fejeztem ki úgy, hogy a kikelt imágók számát arányítottam a fiolákba helyezett peték számához.

4.4.3. A SMART módszer

Újjonnan kikelt *mwh/mwh* nőstényeket kereszteztem *flr³/In (3LR) TM2, Ubx* hímeikkel. Petéket gyűjtöttem ezektől a szülőktől a petéztető csövek és a táptalaj felhasználásával, amint azt a fentiekben leírtam. A begyűjtött petékből mintánként 50-et normális táptalajt tartalmazó fiolára helyeztem, majd a fiolákat 25°C-on inkubáltam. Három nappal később, a 72±4 órás és III. stádiumos lárvákat *Drosophila* Instant Medium (Carolina Biological Supply, Burlington, NC, USA) típusú táptalajt és 1 ml tömény vagy hígított növényi extraktumot tartalmazó fiolákba tettem és napi szinten követtem a fejlődésüket. A III. stádiumos lárvák táplálkozásukat követően bebábozódtak, majd a

metamorfózist követően kikeltek az imágók, amelyek kétféle genotípusát eltérő fenotípusok alapján, azaz a *TM2* balanszer kromoszóma *Ubx* marker mutációja alapján különítettem el.

A fenotípusos szelekciót követően, a kikelt F1 imágókat 1 ml rögzítő oldatot (2 rész 70%-os etanol és 1 rész glicerin) tartalmazó Eppendorf csövekben tartottam. Ebben a rögzítő oldatban a muslicák meghatározatlan ideig eltarthatók.

A mikroszkópi preparátumok elkészítéséhez kivettem a rögzítő oldatból az imágókat, a szárnyaikat eltávolítottam egy csipesszel, ráhelyeztem a tárgylemezen lévő Faure oldat (30 g gumiarábikum, 20 ml glicerol, 50 g klórhidrát, 50 ml deszt. H₂O) felületére, majd preparálótűk segítségével elrendeztem őket és lefedtem fedőlemezzel. Az így elkészített mikroszkópi preparátumokat 50°C-on szárítottam 24 órát át. Ezt követően elvégeztem a tartósított preparátumok mikroszkópi vizsgálatát először kisebb (600-szoros), majd nagyobb (1000-szoros) nagyítást használva, miközben *mwh/mwh* és *flr³/fl³* magányos vagy iker sejtklónokat kerestem az egyes szárnyakon. A mikroszkópi preparátumok kiértékeléséhez az Olympus CELL-R rendszert használtam.

Tekintettel arra a tényre, hogy az *flr³* marker mutációnak alacsony az expressziója a kevés sejtből álló klónok esetében – a sejtklónok nagy letalitása miatt – a kísérleteimben csak az *mwh/mwh* klónokat vettem figyelembe a klónok gyakoriságának kiszámítása során. A magányos és iker sejtklónok gyakoriságát összevettem a kontrollként alkalmazott, normál táptalajon fejlődött egyedek, illetve a növényi extraktummal kezelt egyedek gyakoriságával.

4.5. A humán sejtvonalak tenyésztése és vizsgálata

4.5.1. Az alkalmazott humán emlőrák sejtvonalak

Kísérleteim során kétfajta adherens, duktális emlőkarcinoma sejtvonalat használtam, melyeket az „American Type Culture Collection”-től (ATCC, USA) szereztem be. A T-47D (HTB-133) sejtvonal egy 54 éves páciens daganatából, míg a ZR-75-1 (CRL-1500) sejtvonal egy 63 éves beteg emlőjéből származtak. A sejtek osztódását tekintve a T-47D duplázódási ideje megközelítőleg 32 óra, a ZR-75-1 sejtvonalé 80 óra.

4.5.2. Sejtenyésztési körülmények

A fentiekben említett humán emlőkarcinoma sejtvonalakat a megfelelő tápoldatukban (RPMI-1640 médium, Lonza) tenyésztettem 25 cm²-es (T25-ös) vagy 75 cm²-es (T75-ös) tenyésztőflaskában. A tápoldathoz 10% FBS-t (Fetal Bovine Serum, Sigma, F7524), 1% Antibiotikum-Antimikoticumot (Invitrogen-Gibco, 504281), 0,1% 1 mM-os nátrium-piruvátot (C₃H₃NaO₃, Biochromag, L0473) adtam és egy 37°C-os, 5% CO₂ tartalmú termosztátban, megfelelő páratartalom mellett biztosítottam a sejtek életéhez szükséges optimális körülményeket.

4.5.3. Az MTT viabilitás/proliferációs teszt

A daganatos sejtek proliferációváltás vizsgálatára irányuló kísérleteket 70-80%-os konfluencia elérésénél kezdtem el. A konfluencia figyelemmel való kísérése meghatározó a kísérlet szempontjából, ugyanis bizonyos sejtkultúrák esetében amennyiben a sejtek elérik a teljes konfluencia állapotát, differenciálódásnak indulnak, számos sejtfüggőségük módosul, és több tulajdonságuk is eltérővé válik a még szubkonfluens sejtkultúra proliferálódó sejtjeitől (Ryle *et al.*, 1989). Először az adherens sejtekről eltávolítottam a tápoldatot, majd kétszeres PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich) mosást követően tripszin (1-3 ml, 2,5%) (Sigma) hozzáadásával felszedtem a tenyésztőflaska aljáról azokat. A tripszin hidrogén-híd bontó képessége végett ügyelni kell arra, hogy ne roncsolódjanak a sejtek, ezért maximum 3-5 perc után háromszoros mennyiségű tápoldattal le kell állítani a tripszin ezen aktivitását. A szuszpenzióban lévő sejteket centrifugáltam (1250 rpm, 2 perc), majd az 1 ml végtérfogatra beállított szuszpenzióból 10 µl-t megfestettem 10 µl tripánkéssel, és Bürker-kamra segítségével normál fénymikroszkóp alatt megszámláltam a sejteket.

A 96 lyukú plate-be 10 ezer sejtet pipettáztam lyukanként, RPMI-1640 tápoldatba. Egy napot hagytam a sejteket regenerálódni, majd a tápoldatot az általam készített kivonatok különböző koncentrációját (10-0,31 v/v%) tartalmazó tápoldatra cseréltem és hagytam a sejteken 48- illetve 72 óráig. Minden kísérlet alkalmával hagytam egy kezeletlen kontroll csoportot. A kezelést követően a lyukakból eltávolítottam a tápoldatot és 10 µl 5 mg/ml koncentrációjú MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma) oldattal 3 órán át inkubáltam a sejteket a már említett tenyésztési körülmények között. A sárga színű MTT oldat az élő sejtek mitokondriumában redukálódik bordó színű formazán kristállyá, melyet lyukanként 100

µl MTT szolubilizáló oldattal (0,1 mM HCl tartalmú izopropanol oldat; 100 ml izopropanol + 0,825 HCl → 90 ml + 10 ml Triton X-100) feloldottam és egy plate-reader (BioTek EL808) segítségével 540 nm hullámhosszon megmértem a fényabszorpció értékét, melynek értéke egyenes arányban van az élő sejtek számával.

4.5.4. Az immunfestés

Az immunfestések során a centroszómákra (egér monoklonális Anti-humán Polokináz 1 antitest) és mikrotubulusokra (YL ½; patkány monoklonális Anti-α-tubulin antitest) specifikus elsődleges ellenanyagokat használtam, a másodlagos ellenanyagok a vörösen világító Alexa 594 és a zölden világító Alexa 488 (Sigma) nevű fluoreszcens festékek voltak. A kromoszómák DNS-ét DAPI-val festettem.

Az eredményeim értékeléséhez az Olympus CELL-R rendszert használtam, amely a DAPI (kék), Texas-red (piros) és FITC (zöld) specifikus excitációs és emissziós szűrőkkel van felszerelve, így az egyes kromogének külön jelként detektálhatók.

Az emlőtumoros sejtek immunfestésének menete a következő volt (Lemos *et al.*, 2000; Máthé *et al.*, 2004):

- Az emlőkarcinóma sejt vonalakat megfelelő növényi kivonattal kezeltem 48 óráig, 4 lyukú plate-ben, 1,25 v/v %-os RPMI-1640 tápoldatban a normál sejttenyésztésnek megfelelő körülmények között. A kísérletbe vont sejtek letapadása a lyukakba helyezett kör alakú fedőlemezekre történt.
- A kezelést követően 3x1 ml PBS-el 3x5 percig mostam a mintákat.
- Végrehajtottam az első fixálást olyan fixálószerrel alkalmazva lyukanként, amely a következő komponenseket tartalmazta: 280 µl PBS, 120 µl 10% paraformaldehid oldat PBS-ben (amelyet mindig frissen kell elkészíteni, nem tárolható) és 500 µl heptán.
- 45 másodpercig homogenizáltam az első fixálószerben lévő mintát, majd a tárolóba helyezve megvártam, hogy a két fázis (szerves és vizes) elváljon egymástól. Amint ez megtörtént egy kapilláris csővel eltávolítottam a fixálószerrel.
- Újabb fixáló oldatot készítettem, amelynek összetétele: 520 µl PBS, 240 µl 10% paraformaldehid oldat PBS-ben és 40 µl DMSO. 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltam a mintákat, majd ezen második fixálószer eltávolítása után 2x1 percig 1 ml abszolút metanolban mostam a mintákat.

- A harmadik fixálás érdekében újabb fixálószeret készítettem, amelynek összetevői: (980 µl abszolút metanol és 20 µl hidrogén-peroxid)/lyuk. Ez a fixálás 30 percig tartott szobahőmérsékleten.
- Eltávolítottam a metanolt egy mikropipetta segítségével, és 3x3 percig Tri-PBS (0,2 % Triton-X 100 PBS-ben) oldatban mostam a mintákat.
- Ezután 1 ml Tri-PBS oldathoz 50 µl FCS oldatot adtam, majd 60 percig szobahőmérsékleten inkubáltam a mintákat.
- Ezt követően hozzáadtam az elsődleges ellenanyagokat a sejtekhez, majd az ellenanyagos inkubációt 16 órán át 4 °C-on, sötétben, a rotán lassú forgatás közben folytattam. Figyelni kell az ellenanyagok megfelelő hígítási arányaira!
- Az inkubációs idő leteltekor eltávolítottam az elsődleges ellenanyagokat, majd 2x1 ml Tri-PBS oldatban 5 perces mosásokat végeztem a mintákon.
- A mintákat a másodlagos ellenanyagok (1:200 hígítások) oldatában 2 óráig inkubáltam szobahőmérsékleten vagy 4 °C-on 16 órán át.
- Az inkubációs idő letelte után a másodlagos ellenanyagok oldatát eltávolítottam, majd a mintákon 2x1ml Tri-PBS oldattal 5 perces mosásokat végeztem.
- A minták DNS festésekor az 1ml Tri-PBS-hez 1 µl DAPI (1:1000) festéket adtam, és sötétben, szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltam.
- Egy kapilláris pipetta segítségével a DNS festékoldatot eltávolítottam és a mintákat 3x1 ml PBS oldatban mostam 1 percig.
- Az utolsó mosás után 950 µl PBS oldatot eltávolítottam, majd 1-2 csepp Vectashield mounting medium-ban (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) tároltam a mintákat 4 °C-on, 16 órán át.
- Végül a megtisztított tárgylemezre üveg Pasteur-pipettával felvittem egy kisebb térfogatú Vectashield beágyazó anyagot, majd a megfestett oldalával ráhelyeztem a sejtes fedőlemezt. A fölösleges fixáló oldatot 3MM Whatman papírral eltávolítottam, majd körömlakkal lefestettem a fedőlemez széleit hogy légmentesen lezárjam. Az így előkészített preparátum 4°C-on, sötétben akár több éven keresztül is stabil marad.

4.6. Adatfeldolgozás és kiértékelés

A mérési adatok rendszerezését és elsődleges feldolgozását a Microsoft Office Excel 2007-es programmal, valamint a TraceFinderTM szoftverrel végeztem. A különböző értékek szignifikáns eltéréseinek vizsgálata SPSS 16.0 szoftver, One-Way ANOVA Tukey teszt segítségével történt. Az egyes különbségek $p < 0,05$ értéknél tekinthetők szignifikánsnak.

5. EREDMÉNYEK

Kutatásaim során fontos szempont volt, hogy a növényi extraktumok élettani hatásainak vizsgálata előtt elvégezzem azok bioaktív hatóanyagainak meghatározását, azaz kémiai térképezését („chemomapping”). Ez a kísérleti megfontolás jelen pillanatban még nem képezi alapját a növényi extraktumok tanulmányozásának, mivel a korábbi és többségében a jelenlegi hatástani tanulmányok is a homogenitásig tisztított hatóanyagokat preferál(ták)ják. Ezt a tényt többféleképpen lehet magyarázni. Egyfelől korábban nem rendelkezünk olyan analitikai kémiai módszerekkel, melyek révén egy extraktumból több komponens is be lehetett volna egyidejűleg azonosítani. Másfelől az élettani hatásvizsgálatoknál a beviteli oldal minél pontosabb definíciójára törekedtek, tartva a sokkomponensű extraktumokkal kapcsolatos eredmények megismételhetőségétől és összevethetőségétől, és akkor még nem is említettük a vizsgálati alanyok genetikai variabilitásából fakadó eredménybeli különbségeket. Ugyanakkor a növényi hatóanyagok komplex módon, sok más molekulával kölcsönhatásban fejtik ki az állati/emberi szervezetre és sejtekre gyakorolt hatásukat. Így logikusnak tűnik, hogy a növényi extraktumokat a maguk komplexitásában kellene vizsgálni, amint lehetőség nyílik az extraktumok hatóanyag komponenseinek minél pontosabb meghatározására.

A Nyíregyházi Egyetem (korábban Nyíregyházi Főiskola) Agrár és Molekuláris Kutató Intézetében olyan kutatási kapacitást alakítottak ki, amely lehetővé tette a növényi extraktumok kémiai összetételének és élettani hatásainak komplex vizsgálatát. Az intézetben elvégezték számos tájjellegű-, és egzotikus növény emberi fogyasztásra alkalmas részeinek beltartalmi vizsgálatát és elkezdték ezek élettani hatásainak az elemzését is. Az articsóka- és görögszéna kivonatok éppen a bennük található bioaktív hatóanyagok és az extraktumok tumorelleses hatása miatt kerültek a kutatásaim középpontjába.

5.1. Az articsóka extraktumok bioaktív hatóanyag-tartalmának UHPLC-ESI-MS jellemzése

A szárított articsóka levélben megtalálható bioaktív hatóanyagok azonosítása érdekében vizes és alkoholos extraktumokat készítettem (Anyag és módszer fejezet), majd UHPLC-ESI-MS vizsgálatot végeztem, amelynek segítségével 12 féle vegyületcsoport egyes tagjait találtam meg (1.-4., 9.-10. melléklet). Ezeket a vegyületcsoportokat és a talált bioaktív hatóanyagokat az alábbiakban mutatom be.

Az alkaloidok esetében kinurénsavat, trigonellint és sztahidrint találtam a vizes extraktumban, míg az alkoholos extraktumban csak kinurénsav és trigonellin volt azonosítható, azaz a sztahidrin nem volt jelen az alkoholos articsóka extraktumban (6. táblázat).

6. táblázat: Az azonosított alkaloidok a vizsgált articsóka extraktumokban

Alkaloidok	Vizes articsóka	Alkoholos articsóka
Kinurénsav	+	+
Trigonellin	+	+
Sztahidrin	+	

A jelenlegi szakirodalmi ismereteim szerint az alkaloidok esetében először került kimutatásra articsókában a kinurénsav, a trigonellin és a sztahidrin. A kinurénsav a triptofán egyik anyagcsere-terméke. Számos kutatás igazolta a kinurénsav neuroprotektív hatását (Sas *et al.* 2007), de vizsgálták a fájdalomcsillapításban betöltött szerepét is. Kékesi *et al.* (2002) igazolta és megállapította, hogy a kinurénsav önmagában sem egyszeri, sem folyamatos adagolás mellett nem alkalmas fájdalomcsillapításra, ugyanakkor az endomorfín-1 kis dózisu kombinációjával mellékhatások nélkül rendkívül hatékonyan bizonyult gyulladáscsökkentő modellrendszerekben. A trigonellin előfordulását kávé és görögszéna kivonatokból már korábban kimutatták, továbbá laboratóriumi adatok igazolták e vegyület Nrf2 gátló hatását és a proteaszóma gének Nrf2-függő génkifejeződésének blokkolását is, valamint hasnyálmirigysejtekben csökkentette a proteaszóma aktivitást (Arlt *et al.*, 2013). A sztahidrin a prolinbetain alkaloid egyik típusa, melynek fontos szerepe van a szív- és érrendszeri betegségek megelőzésében azáltal, hogy a *SIRT1* gén modulációján keresztül gátolja az endotél sejteken a magas glükóz szint által okozott patológiákat (Servillo *et al.*, 2013).

A beazonosítható aminosavak tekintetében is voltak különbségek a vizes és az alkoholos extraktumok között (7. táblázat).

A fenilalanin és az aszparagin kivételével (Bernhard, 1972) a 7. táblázatban feltüntetett aminosavak közül az összes többi vegyületet először nekem sikerült kimutatni articsóka extraktumból.

7. táblázat: Az azonosított aminosavak a vizsgált articsóka extraktumokban

Aminosavak	Vizes articsóka	Alkoholos articsóka
2-Hidroxi-fenil-alanin	+	+
4-Guanidino-vajsav	+	+
Arginin	+	+
Aszparagin	+	+
L-Fenil-alanin	+	+
γ -Glutamil-fenil-alanin	+	+
Triptofán	+	+
N-Acetil-izoleucin		+
N-Acetil-leucin		+

A kumarinok egyes képviselői mindkét articsóka kivonatban kimutathatók voltak (8. táblázat). Érdekes módon a szkopoletin csak az alkoholos articsóka extraktumban található meg.

8. táblázat: Az azonosított kumarinok a vizsgált articsóka extraktumokban

Kumarinok	Vizes articsóka	Alkoholos articsóka
7-Metoxi-4-metilkumarin	+	+
4-Hidroxi-3-metoxi-fahéjaldehid	+	+
Szkopoletin		+

Mindkét articsóka kivonatból kimutatott új vegyületként a 7-Metoxi-4-metilkumarin került beazonosításra, mely vegyület a verapamil-hoz (kumarin) hasonlóan multidrog rezisztens modulátorként viselkedik és tumorsejteken nagyobb citotoxikus hatást mutat, mint a normál sejteken (Kawase *et al.*, 2005). A szintén mindkét extraktumban megtalálható 4-Hidroxi-3-metoxi-fahéjaldehid, amely patkánykísérletekben javította a szívritmuszavart a ROS előállítás gátlásával, autofágiát indukált a TLR4-NOX4 jelátvitelen át és gyulladáscsökkentő hatással is rendelkezett (Zhao *et al.*, 2016). Más kutatási eredményekhez hasonlóan (Hinou *et al.*, 1989) sikeresen beazonosítottam a szkopoletint az alkoholos articsóka kivonatban, mely vegyület egérkísérleteken az NF- κ B és a p38 MAPK foszforilációjának gátlásával fejt ki az erős gyulladáscsökkentő hatását (Pereira *et al.*, 2016).

A flavonoidok egyes képviselői mindkét articsóka kivonatban kimutathatók voltak (9. táblázat). A 9. táblázatban látható, hogy az articsókából izolált flavonoidok közül beazonosítottam a már korábban kimutatásra került apigenin, apigenin-7-O-glükozid (Cosmosiin), apigenin-7-O-glükuronid, luteolin-7-O-glükuronid, luteolin-7-O-glükozid

és az apigenin-7-O-rutinozid (Isorhoifolin) vegyületeket (Wang *et al.*, 2003; Negro *et al.*, 2012; Magielse *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2015). A diosmetin, a salvigenin, a naringin-dihidro-kalkon és a vicenin-2 az általam készített kivonatokban került először beazonosításra, azon belül is a legtöbb az alkoholos articsóka kivonatban fordult elő.

9. táblázat: Az azonosított flavonoidok a vizsgált articsóka extraktumokban

Flavonoidok	Vizes articsóka	Alkoholos articsóka
Ismeretlen apigenin származék		+
Apigenin		+
Cosmosiin (Apigenin-7-O-glükozid)	+	+
Diosmetin (Luteolin-4-metiléter)		+
Luteolin	+	+
Luteolin-7-O-glükozid	+	+
Luteolin-7-O-glükuronid	+	+
Apigenin-7-O- glükuronid	+	+
Luteolin-7-O-rutinozid	+	+
Isorhoifolin (Apigenin-7-O-rutinozid)		+
Salvigenin		+
Naringin-dihidro-kalkon		+
Vicenin-2 (6,8-Di-C-glükozilapigenin)	+	+

Korábbi kutatások azt bizonyítják, hogy a diosmetin gátolja a májkarcinóma sejtek metasztázisát (Patel *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2016), míg a salvigenin antitumor és immunomoduláns hatását daganathordozó egereken igazolták. Az immunomoduláns hatóanyagok elnyomják a szervezet immunreakcióját és megakadályozzák, hogy az autoimmun betegségben (pl. Sclerosis multiplex (SM)) szenvedők szervezete, azaz az immunitásban szerepet játszó fehérvérsejtek egymást vagy a saját sejtjeit megtámadja (Noori *et al.*, 2013). A naringin dihidrokalkon biológiai hatását napjainkig sem ismerik, bár a fő hatóanyagát a naringint – amely a kínai Ganshuang granulátum fő komponense – régóta ajánlják a kínai orvoslásban antifibrotikus hatása miatt, melyeket *in vitro*, cirhózisos (idült szövetközötti gyulladással) egér modellrendszereken igazoltak, a májzsugorodásért felelős sejtek deaktiválása révén (Shi *et al.*, 2016). A naringin a rákos sejtek növekedését is elnyomhatja, az EGFR/ERK (Epidermal Growth Factor Receptor/Extracellular signal Regulated Kinase) jelátvitel gyengítése révén (Yoshinaga *et al.*, 2016). A vicenin-2 esetében korábbi kutatások megállapították, hogy a magas glükóz szint által kiváltott érgyulladásos folyamatokat képes gátolni egerekben és a humán köldökvéna eredetű endotéliális sejtekben. Ezen tulajdonságánál fogva

gyógyászati hatóanyagként is ajánlják az érrendszeri gyulladásoos betegségekre (Ku és Bae, 2016; Kang *et al.*, 2015). A flavonvázás apigenin bizonyítottan toxikus a daganatos sejtekre (Choi és Kim, 2009; Yuan *et al.*, 2009), antioxidáns (Özyürek *et al.*, 2009) és göröcsoldó hatással bír (Duarte *et al.*, 1993; Amira *et al.*, 2008). A flavanol vázás luteolin szintén antioxidáns (Ashokkumar és Sudhandiran, 2008) és gátolja a sejtburjánzást, ezáltal a daganatok kialakulását (Hou *et al.*, 2009).

Az egyéb metabolitok egyes képviselőit mindkét articsóka kivonatban kimutattam (10. táblázat).

10. táblázat: Az azonosított egyéb metabolitok a vizsgált articsóka extraktumokban

Egyéb metabolitok	Vizes articsóka	Alkoholos articsóka
Indol-4-karbaldehid	+	+
Kolin	+	+
Fahéjsav-metilészter (metil-cinnamát)		+
Fenetilamin	+	+

A 10. táblázatban feltüntetett metabolitok közül a korábbi kutatásokhoz hasonlóan az indol-4-karbaldehid-et azonosítottam, míg a kolin, a fahéjsav-metilésztert és a fenetilamint először én mutattam ki articsóka kivonatokból. Egér-, patkány-, illetve sertés modellrendszereken bebizonyították, hogy a metionin-, illetve kolin hiányos diéták a nem-alkohol eredetű zsírmáj kialakulásához vezetnek azért, mert azt valószínűsítik, hogy a kolin bejuttatása a szervezetbe hozzájárul a szteatózis és fibrózis kialakulásának megelőzéséhez. A fahéjsav metilésztert antibakteriális hatása miatt aromaanyagként használják az élelmiszeripar. További kutatások bebizonyították, hogy gátolja a gyomorbélbántalmak (gastroenteritisz) kialakulását (Lima *et al.*, 2014), a PPAR γ aktivitást és részben az adipociták (speciális zsírsejt a májban) differenciálódását a CaMKK2-AMPK jelátviteli rendszer által (Chen *et al.*, 2012). A fenetilamint mint diétás táplálékkiegészítőt széles körben használják a testsúly csökkentésre (Pawar és Grundel, 2016).

A polifenolok egyes képviselőit mindkét articsóka kivonatban kimutattam (11. táblázat). Az articsóka polifenol tartalmát alaposan tanulmányozták már az évek során, amikor is az egyik fő bioaktív hatóanyag-tartalmát, a cinarint (1,3-Di-O-caffeoylquinic acid) hasonlították össze kifejlett növényekben és palántákban, mind a nyers, mind a főzés utáni állapotában (Lutz *et al.*, 2011). A vizes articsóka kivonatban található polifenolok száma sokkal nagyobb, mint az alkoholos extraktumé, melyek közül számos

olyan bioaktív hatóanyagot tartalmaz, amelyek először kerültek azonosításra articsókából. Ilyen például az 5-O-Caffeoylshikimic savak, az eszkulin és a coumaroylquinic savak (11. táblázat).

11. táblázat: Az azonosított polifenolok a vizsgált articsóka extraktumokban

Polifenolok	Vizes articsóka	Alkoholos articsóka
Cinarin (1,3-Di-O-caffeoylquinic acid)	+	+
5-O-Caffeoylshikimic sav I	+	
5-O-Caffeoylshikimic sav II	+	
Eszkulin	+	+
Ferulasav	+	+
Caffeoylquinic sav I	+	
Caffeoylquinic sav II	+	
Coumaroylquinic sav I	+	
Coumaroylquinic sav II	+	

Az 5-O-Caffeoylshikimic savak biológiai hatásaira vonatkozó irodalmi adatok jelenleg nem fellelhetők. Egérkísérleteken megállapították, hogy az eszkulin gasztroprotektív hatással (gyomorfekély kialakulását gátló hatás) rendelkezik az NF- κ B inaktiválásán keresztül (Li *et al.*, 2016), valamint képes csökkenteni a mitomycin C (kemoterápiás szer) indukálta genotoxicitást (Mokdad *et al.*, 2016). A mitomycin C-t daganatellenes hatása miatt intravénásan adagolják 6 hetente gyomor- és mellrák kialakulás esetén. Gyakrabban történő alkalmazása nem ajánlott, mivel nagyfokú toxicitása révén maradandó csontvelőkárosodást és veseelégtelenséget okozhat a rákos betegeknél (Mao *et al.*, 1999). A ferulasav a kávésav metilált származékának tekinthető, melyet más flavonoidokkal és polifenolokkal együtt antioxidáns, gyulladásgátló és fertőtlenítő hatása miatt ajánlják az olaszperje (*Lolium multiflorum*) extraktumok használatakor (Choi *et al.*, 2016).

A purinok és pirimideinek egyes képviselőit mindkét articsóka kivonatban kimutattam, ugyanakkor az AMP-t és GMP-t csak a vizes extraktumban találtam meg (12. táblázat). Szerepüket tekintve a purinok és pirimidinek fontos szerepet játszanak a purin- és pirimidin ribonukleotidok szintézisében.

12. táblázat: Az azonosított purinok és pirimidinek a vizsgált articsóka extraktumokban

Purinok és pirimidinek	Vizes articsóka	Alkoholos articsóka
5'-S-metil-5'-tioadenozin	+	+
Adenin	+	+
Adenozin	+	+
Adenozin-5'-monofoszfát (AMP)	+	
Citidin	+	+
Guanozin	+	+
Guanozin-5'-monofoszfát (GMP)	+	
Uracil	+	+
Uridin	+	

Kétféle szaponint sikerült kimutatni mindkét articsóka kivonatban (13. táblázat).

13. táblázat. Az azonosított szaponinok a vizsgált articsóka extraktumokban

Szaponinok	Vizes articsóka	Alkoholos articsóka
Cinara-szaponin C	+	+
Cinara-szaponin E	+	+

A cinara-szaponin C és a cinara-szaponin E jelenlétét korábban mások is kimutatták articsókában (Piozzi *et al.*, 1986; Mucaji *et al.*, 2001), azonban ezen vegyületek biológiai hatása jelenleg kevésbé ismert.

A terpenoidok közül a cinaratriolt mindkét extraktumban, míg az urzolsavat csak az alkoholos extraktumban sikerült kimutatni (14. táblázat). Az urzolsavat, mint articsókában előforduló bioaktív komponenst először sikerült kimutatni.

14. táblázat: Az azonosított terpenoidok a vizsgált articsóka extraktumokban

Terpenoidok	Vizes articsóka	Alkoholos articsóka
Cinaratriol	+	+
Urzolsav		+

A cinaratriol biológiai hatása jelenleg még nem tisztázott, míg az urzolsav antioxidatív (hatástalanítja a szabad gyököket) és gyulladáscsökkentő hatásait agysérüléssel egér modellrendszeren igazolták a Keap1-Nrf2-ARE jelátviteli útvonal aktiválása révén (Ding *et al.*, 2016). További kísérleti bizonyítékok szólnak az urzolsav daganatképződést és metasztázist gátló hatása mellett is (Gai *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2016).

A jelenlegi szakirodalmi ismereteim figyelembevételével articsóka extraktumokban először azonosítottam a növényi szteroidok közül a sztearidonsav metilésztert és a sztearidonsav etilésztert (15. táblázat). Mindkét szteroid csak az alkoholos articsóka extraktumban található meg. Habár a detektált szteroidok a sztearidonsav (18:4n-3) származékainak tekinthetők, azaz növényi eredetű ω -3 zsírsavak, ezek állati/emberi szervezetre gyakorolt élettani hatásai nem ismertek.

15. táblázat: Az azonosított szteroidok a vizsgált articsóka extraktumokban

Szteroidok	Vizes articsóka	Alkoholos articsóka
Sztearidonsav metilészter		+
Sztearidonsav etilészter		+

A vitaminok közül (16. táblázat) a C-vitamint, a B-vitaminok csoportjából a tiamint, riboflavint, nikotinamidot és nikotinsavat már korábban kimutatták articsóka kivonatokból (Serni *et al.*, 2013).

16. táblázat: Az azonosított vitaminok a vizsgált articsóka extraktumokban

Vitaminok	Vizes articsóka	Alkoholos articsóka
Nikotinamid	+	+
Nikotinsav (B3)	+	+
Pantoténsav (B5)	+	+
Piridoxál	+	
Piridoxin (B6)	+	+

Kutatások igazálták, hogy a nikotinsav gátolja a lipolízist és a cinarinhoz hasonlóan fokozottan csökkenti a plazma szabad zsírsav-koncentrációját (Kroon *et al.*, 2017). Először igazoltam articsóka kivonatokból a pantoténsav, a piridoxál és a piridoxin jelenlétét. A már említett B5 és B6 vitamin csökkenti a rákos megbetegedés kialakulásának kockázatát (Mocellin *et al.*, 2016). Gominak (2016) kutatásai során leírta a nikotinsav gyulladáscsökkentő hatását, amelynek szerepe lehet az érlemeszesedés és az autoimmun betegségek kialakulásának megelőzésében is.

5.2. A görögszéna extraktumok bioaktív hatóanyag-tartalmának UHPLC-ESI-MS jellemzése

A görögszéna magjában megtalálható bioaktív hatóanyagok azonosítása érdekében vizes és alkoholos extraktumokat készítettem (Anyag és módszer), majd UHPLC-ESI-MS vizsgálatot végeztem, amelynek segítségével 10 féle vegyületcsoport egyes tagjait találtam meg (5.-8., 11.-12. melléklet). Ezeket a vegyületcsoportokat és a talált bioaktív hatóanyagokat az alábbiakban mutatom be.

Négyféle alkaloidot sikerült kimutatnom egyformán mind a két görögszénamag extraktumban (17. táblázat).

17. táblázat: Az azonosított alkaloidok a vizsgált görögszéna extraktumokban

Alkaloidok	Vizes görögszéna	Alkoholos görögszéna
Ekgonin	+	+
Ekgonin metilészter	+	+
Kinurénsav	+	+
Trigonellin	+	+

Jelenlegi szakirodalmi ismereteim alapján görögszénamag extraktumokból alkaloidként először sikerült kimutatni az ekgonint és az ekgonin metilésztert. Egér kísérleteken az ekgonin metilészter hatásosnak bizonyult a kokain által okozott letalítás megelőzésében. Ezt a hatást az ekgonin értágító képességével hozták összefüggésbe (Hoffman *et al.*, 2004). Továbbá a kinurénsavat is először azonosítottam a görögszéna magjában, mely vegyület bizonyítottan a triptofán katabolizmus egyik lépését szabályozza a kinurenin útvonalon keresztül (Lim *et al.*, 2016). Kutatások szerint a kinurénsav jelentős neuroprotektív hatással is rendelkezik (Sas *et al.*, 2007). A trigonellint mint bioaktív hatóanyagot elsőként a görögszénában azonosították. Legfontosabb élettani hatása az Nrf2 transzkripció faktor gátlása, illetve a proteaszómális gének Nrf2-függő expressziójának blokkolása hasnyálmirigyrákos sejtvonalakon (Arlt *et al.*, 2013).

A görögszéna magból készült saját extraktumaiban többféle aminosavat sikerült azonosítani (18. táblázat). A 4-hidroxi-izoleucin (4-HIL) mellett, az aszparagin csak a vizes extraktumban volt jelen, míg aszpartámsavat csak az alkoholos görögszéna kivonat tartalmazott. Az összes többi detektált aminosav mindkét kivonatban fellelhető volt.

18. táblázat: Az azonosított aminosavak a vizsgált görögszéna extraktumokban

Aminosavak	Vizes görögszéna	Alkoholos görögszéna
2-Hidroxi-fenil-alanin	+	+
4-Guanidino-vajsav	+	+
Arginin	+	+
Aszparagin	+	
Betain (trimetil-glicin)	+	+
Glutaminsav	+	+
Aszpartámsav		+
Fenilalanin	+	+
Pipekolsav	+	+
Triptofán	+	+
N- α -acetyl-lizin	+	+
4-Hidroxi-izoleucin (4-HIL)	+	
γ -Glutamil-fenil-alanin	+	+

A 4-HIL kiemelkedő szerepéről már a bevezetésben tettem említést. Hatásai közül mindenképpen ki kell hangsúlyozni az inzulin rezisztencia csökkenését, a glükózfelvétel fokozását (Naicker *et al.*, 2016) és gyulladáscsökkentő hatását (Gautam *et al.*, 2016).

Kumarinok közül csak a szkopoletint sikerült azonosítani az alkoholos görögszéna magkivonatban, míg a vizes kivonatban nem volt jelen. A szkopoletin előfordulását a görögszéna gyökeréből, szárából, hüvelyéből, hajtásából és leveléből készült kivonatokban már korábban kimutatták (Reppel és Wagenbreth, 1958; Wang *et al.*, 1997). Egérkísérleteken bebizonyították, hogy a szkopoletinnek jelentős gyulladáscsökkentő hatása van az NF- κ B és a p38 foszforilációjának gátása révén (Pereira Dos Santos Nascimento, 2016), valamint gátolja a humán tumorok vaszkularizációját xenograft modellrendszerekben (Tabana *et al.*, 2016).

Az általam azonosított flavonoidok közül (19. táblázat) néhányról már bizonyították előfordulásukat a görögszéna magjában. Ezek a következők: naringenin, vitexin (apigenin-8-C-glükozid), luteolin-8-C-(2''-O-(E)-p-coumaroyl-glükozid), izoorientin, vicenin-1, vicenin-2, vicenin-3 (6-C-glükozil-8-C-xilozil -apigenin), az apigenin-6-C-glükozid-8-C-ramnozid, a krizoeriol és a tricín (Skalta, 2002; Benayad *et al.*, 2014; Yoshikawa *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2013; Sattiraju és Chandrashekar, 2014). Azonban a tricín-7-O-glükozid, a genisztein, az izovitexin (apigenin-6-C-glükozid), a medikarpin, a szkoparin és az apigenin-6-C-glükozid-8-C-ramnozid az én kutatásaim során került először felfedezésre a görögszéna magjából

készített extraktumokban. A 19. táblázatból az is kitűnik, hogy az alkoholos görögszéna magkivonatban sokkal több flavonoid található.

19. táblázat: Az azonosított flavonoidok a vizsgált görögszéna extraktumokban

Flavonoidok	Vizes görögszéna	Alkoholos görögszéna
Naringenin		+
Krizoeriol		+
Tricin		+
Luteolin-8-C-(2''-O-(E)-p-coumaroylglükózid)		+
Tricin-7-O-glükózid		+
Genisztein		+
Vitexin (Apigenin-8-C-glükózid)		+
Izovitexin (Apigenin-6-C-glükózid)	+	+
Medikarpin		+
Szkoparin (Krizeriol-8-C-glükózid)		+
Vicenin-2 (6,8-Di-C-glükozilapigenin)	+	+
Apigenin-di-C-hexozid (Vicenin-2-izomer)	+	+
Vicenin-3 (6-C-glükozil-8-C-xilozilapigenin)	+	+
Isoorientin (Homoorientin, Luteolin-6-C-glükózid)	+	+
Vicenin-1 (6-C-xilozil-8-C-glükozilapigenin)	+	+
Apigenin-6-C-glükózid-8-C-ramnozid	+	+

A szkoparin egy krizoeriol glükózid származék, melynek biológiai hatása jelenleg nem ismert. A krizoeriol esetében viszont kimutatták, hogy 3T3-L1 sejtekben részben gátolja az adipogenezist (az adipociták, a zsírszövetek fejlődése) a triacilglicerol felhalmozódás blokkolása által (Nishina *et al.*, 2015). További *in vitro* kutatások igazolták a krizoeriol PI3K-AKT-mTOR jelátvitel gátló hatását is. A genisztein egy ösztrogén agonista, amely tumorellenes hatással bír a HT29 vastagbél daganatos sejtek esetében (Shafiee *et al.*, 2016). A vitexin egyik izomerje, az izovitexin (apigenin-6-C-glükózid) általában a vitexinnel együtt található meg különböző növényekben, melyek

együtt többféle élettani hatással rendelkeznek. Ezek közül az antioxidáns, a gyulladáscsökkentő, a fájdalomcsökkentő és a neuroprotektív hatások a jelentősebbek (He *et al.*, 2016). A medikarpin az oszteogenezist indukáló hatása segítségével előmozdítja a csontok regenerálódását a Wnt és a Notch jelátviteli út aktivációja által (Dixit *et al.*, 2015). A medikarpinnal végzett *in vitro* kísérletek során pro-apoptotikus hatást detektáltak drog-szenzitív és drog-rezisztens leukémia (P388) sejtvonalakban (Gatouillat *et al.*, 2015).

Az egyéb metabolitok csoportjában, a görögszénamagból készített vizes és alkoholos kivonatok kapcsán először írtam le a szotolont (3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanon) és a szacharopint, mint új bioaktív komponenst (20. táblázat). A szotolont korábban a görögszéna hajszálgököreiből már kimutatták (Peraza-Luna *et al.*, 2001). A szotolon jelenlétét azokban az oxidált italokban tanulmányozták részletesen, amelyben leginkább hozzájárult a jellegzetes “Madeira-oxidált” aromák kialakulásához (Scholtes *et al.*, 2015).

20. táblázat: Az azonosított egyéb metabolitok a vizsgált görögszéna extraktumokban

Egyéb metabolitok	Vizes görögszéna	Alkoholos görögszéna
Szotolon (3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanon)	+	+
Szacharopin	+	+
Kolin	+	+

A szotolon állati/emberi szervezetre gyakorolt hatása nem ismert. A fejlődő növényi szövetekben a lizin katabolizálása (lebontása) a szacharopinon keresztül történik, mely a kukorica magban részt vesz a növényi stresszválaszban (Kiyota *et al.*, 2015). Emlősök miotubulusának vizsgálata esetében megállapították, hogy a szacharopin stimulálja az Akt és az mTOR jelátvitelt, amely elnyomja az autofág proteolízist és csökkentheti az izomsorvadást (Sato *et al.*, 2015). Egy másik metabolit, a kolin jelenlétét mindkét görögszénamagból készült kivonatomban kimutattam. Korábbi kutatások során bebizonyították, hogy a kolin javíthatja az izomfunkciókat a glükóz és a zsírsavak metabolizmusa révén az inzulin rezisztens egerekben (Taylor *et al.*, 2016). Ez a folyamat a zsírsav- és a triglicerid szintézishez szükséges glükóz felhasználás csökkenésével valósul meg, mely által fokozódik az izom glükóz- és glikogén raktára. A kolin orvosságként történő alkalmazása a nem alkoholos steatohepatitis (NASH) és a fibrózis kialakulásának prevenciójánál javasolt.

A vizes és alkoholos görögszéna magkivonatokban két polifenol volt található: a rezveratrol és a p-kumarinsav. Az alkoholos magkivonatról most először derült ki, hogy rezveratrolt tartalmaz. Kutatások során bebizonyították, hogy a rezveratrol befolyásolja a lipidek és az arachidonsav metabolizmusát, továbbá antioxidáns tulajdonságának köszönhetően szerepet játszik a neurodegeneratív-, szív- és érrendszeri betegségek valamint a metabolikus zavarok prevenciójában és/vagy terápiájában (Nguyen *et al.*, 2017a). A p-kumarinsav egy olyan fitokemikália, mely gátolja a nitrózaminok sejten belüli kialakulását, ezáltal csökkentve a vastag- és végbélrák kialakulásának kockázatát (Saravana *et al.*, 2013).

Az 21. táblázatban látható, görögszéna magkivonatból beazonosított purin és pirimidin vegyületek közül először mutattam ki az 5'-S-Metil-5'-tioadenozin, a 2'-deoxiadenozin, az adenin, az adenzin, az adenzin 3',5'-ciklikus-monofoszfát (cAMP), a citidin, a flavin mononukleotid (FMN), a guanin, a guanizin, az S-adenozil-homocisztein, az uridin és a xantin jelenlétét.

Fontos kiemelni, hogy az 5'-S-Metil-5'-tioadenozin, a flavin mononukleotid (FMN) és a xantin csak az alkoholos magkivonatban, míg az adenin, a cAMP, a citidin és a guanin csak a vizes extraktumban fordul elő. Az almákban jelen lévő 5'-S-metil-5'-tioadenozin összefüggésbe hozható a metioninből történő etilén bioszintézis átalakításával (Adams és Yang, 1977). Az S-adenozil-homocisztein minden egyes S-adenozilmetionin-függő transzmetilációs reakció melléktermékének tekinthető. A szervezetben történő előfordulása kapcsolatban áll a szív- és érrendszeri betegségekkel, a vesebetegséggel, a cukorbetegséggel és a kóros elhízással (Xiao *et al.*, 2015).

Számos kutatás során részletesen tanulmányozták a görögszéna vegetatív szerveinek és magjának szaponin tartalmát (Khanna és Jain, 1973; Varshney és Beg, 1978; Grangrade és Kaushal, 1979; Yoshikawa *et al.*, 1997; Yoshikawa *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 2000). Az általam vizsgált hazai termesztésű görögszénamag trigoneozid profilja (22. táblázat) eltérő volt azokéhoz képest, amelyek Indiából vagy Egyiptomból származtak. Az indiai görögszéna magból készített extraktumokkal összehasonlítva megállapítható, hogy míg a trigoneozid Ia, Ib, IIa, IIIa és a IVa jelen volt az általam készített kivonatokban is, addig a trigoneozid IIb, IIIb, Va, Vb, VI, VIIb, VIIIb és a trigoneozid IX nem volt kimutatható.

21. táblázat: Az azonosított purinok és pirimidinek a vizsgált görögszéna extraktumokban

Purinok és pirimidinek	Vizes görögszéna	Alkoholos görögszéna
5'-S-Metil-5'-tioadenozin		+
2'-Deoxiadenozin	+	+
Adenin	+	
Adenozin	+	+
Adenozin 3',5'-ciklikus-monofoszfát (cAMP)	+	
Citidin	+	
Flavin mononukleotid (FMN)		+
Guanin	+	
Guanozin	+	+
S-Adenozil-homocisztein	+	+
Uridin	+	+
Xantin		+
Xantozin	+	+

Továbbá olyan trigoneozidok, mint a Xa, Xb, XIIa és a XIIIa szintén jelen volt az általam készített kivonatokban, viszont az egyiptomi görögszénamagokhoz hasonlítva nem volt beazonosítható a trigoneozid XIIb és a XIIb. A szójaszaponin I jelenlétét csak az alkoholos kivonatban tudtam kimutatni. A szójaszaponin I gátolja a Renin-Angiotenzin-Aldoszteron Rendszert (RAAS; renin–angiotensin–aldosterone system), ami szabályozza a vérnyomást és a folyadék egyensúlyt, mely által a szójaszaponin I potenciális természetes vérnyomáscsökkentő komponensnek tekinthető (Tavassoli *et al.*, 2017).

A terpenoidok jelenlétére vonatkozóan a görögszéna magjában, az alkoholos extraktumban először én szolgáltatam bizonyítékot az urzolsav azonosításával. Az urzolsav antioxidatív és gyulladáscsökkentő hatását korábban agysérüléssel egér modellrendszeren igazolták az Nrf2-ARE jelátviteli út aktiválása révén (Ding *et al.*, 2016). Továbbá bizonyították az urzolsav daganatellenes és anti-metasztázisos hatását is (Gai *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2016).

22. táblázat: Az azonosított szaponinok a vizsgált görögszéna extraktumokban

Szaponinok	Vizes görögszéna	Alkoholos görögszéna
Szója szaponin I		+
Trigoneozid Ia	+	+
Trigoneozid Ib	+	+
Trigoneozid IIa	+	+
Trigoneozid IIIa	+	+
Trigoneozid IVa	+	+
Trigoneozid VIII	+	+
Trigoneozid Xa	+	+
TrigoneozidXb	+	+
Trigoneozid XIIa	+	+
Trigoneozid XIIIa	+	+
Asparasaponin I (Protodisocin, Trigonelloside C)	+	+
Trigofoneoside C	+	+
Trigofoneoside G	+	+
Protoneogitogenin-S5		+
Protoyukkagenin-S4	+	+

A görögszéna magkivonatok vitamin tartalmát illetően a már mások által azonosított és publikált B-vitaminok közül (Picci, 1959; Venkataramani, 1950) a biotin kivételével én is kimutattam a niacin (B3), a pantoténsav és a piridoxin jelenlétét, míg a nikotinamidot először detektáltam mindkét görögszénamag kivonatban (23. táblázat).

A tiamin, a riboflavin és a cianokobalamin (B12-vitamin) a fragmentáció hiányában nehezen volt detektálható a görögszéna kivonataimban, jelenlétükre csak a megegyező molekulatömeg csúcsokból következtethettem, ezért nem tüntettem fel a 23. táblázatban. Néhány B-vitamint mint rákos megbetegedések kialakulását csökkentő bioaktív hatóanyagot tartanak számon (Mocellin *et al.*, 2016), továbbá gyulladáscsökkentő hatásuk mellett az atherosclerosis (ütőér elmeszesedése) ellen is hatásos lehet (Gominak, 2016).

23. táblázat: Az azonosított vitaminok a vizsgált görögszéna extraktumokban

Vitaminok	Vizes görögszéna	Alkoholos görögszéna
Nikotinamid	+	+
Nikotinsav (B3)		+
Pantoténsav (B5)	+	+
Piridoxin (B6)	+	+

5.3. Az articsóka és a görögszéna extraktumok bioaktív hatóanyag-tartalmának és *in vitro* antioxidáns paramétereinek összehasonlító jellemzése

Az articsóka és görögszéna extraktumaim UHPLC-ESI-MS vizsgálata során kiderült, hogy bioaktív hatóanyag-tartalmukat tekintve hasonlóságok és különbségek is fellelhetők. A 24. táblázatban számszerűsítve láthatók a különböző kivonataimból nagyfokú biztonsággal (molekulatömeg, fragmentáció és izotóp eloszlás alapján) beazonosított bioaktív hatóanyagok az egyes vegyületcsoportokon belül.

24. táblázat: A növényi extraktumokban talált bioaktív hatóanyagok száma vegyületcsoportonként

Adatbázis találatok	Vizes articsóka	Alkoholos articsóka	Vizes görögszéna	Alkoholos görögszéna
Alkaloidok	3	2	4	4
Aminosavak	7	9	12	11
Kumarinok	2	3	-	1
Flavonoidok	7	13	7	16
Egyéb metabolitok	3	4	3	3
Polifenolok	9	3	1	2
Purinok és pirimidinek	9	6	10	9
Szaponinok	2	2	14	16
Terpenoidok	1	2	-	1
Szteroidok	-	2	-	-
Vitaminok	5	4	3	4
Összesen	48	50	54	67

Fontos kiemelni, hogy a vizes és alkoholos extraktumok előállítására, valamint az UHPLC-ESI-MS mérések mindkét növény esetében azonos módon történtek, így a bioaktív hatóanyagok jelenlétére vonatkozó eredmények összehasonlíthatók.

A vizsgált növényekre vonatkozó bioaktív hatóanyagok számát tekintve – összehasonlítva az adott növény vizes és alkoholos extraktumait – a következő relatív szembetűnő különbségek figyelhetők meg:

- A flavonoidok tekintetében közel kétszer annyi bioaktív hatóanyagot sikerült azonosítani az alkoholos extraktumban, mint a vizes kivonatban. Ennek az lehet a magyarázata, hogy az alkoholos extrahálás feltehetőleg sokkal hatékonyabbnak bizonyult.

- Szteroidokat csak az alkoholos articsóka kivonatban találtam.
- A polifenolok esetében a legtöbb bioaktív hatóanyagot a vizes articsóka kivonatban azonosítottam, mivel feltételezhetően a vizes extrahálás hatékonyabb.
- A szaponinok kapcsán el lehet mondani, hogy alig vannak különbségek a vizsgált növények vizes és alkoholos kivonatai között. Azonban az articsóka kivonatokban sokkal kisebb számú szaponin-szerű molekula található, mint a görögszéna kivonatokban.

Látva az articsóka és a görögszéna extraktumok közötti eltérést, valamint a bioaktív hatóanyagok típusait és számát illető különbségeket megfogalmazható az a kérdés, hogy vajon ezek a kémiai összetétellel kapcsolatos eltérések kihatással lesznek-e az egyes extraktumok által generált élettani hatásokra?

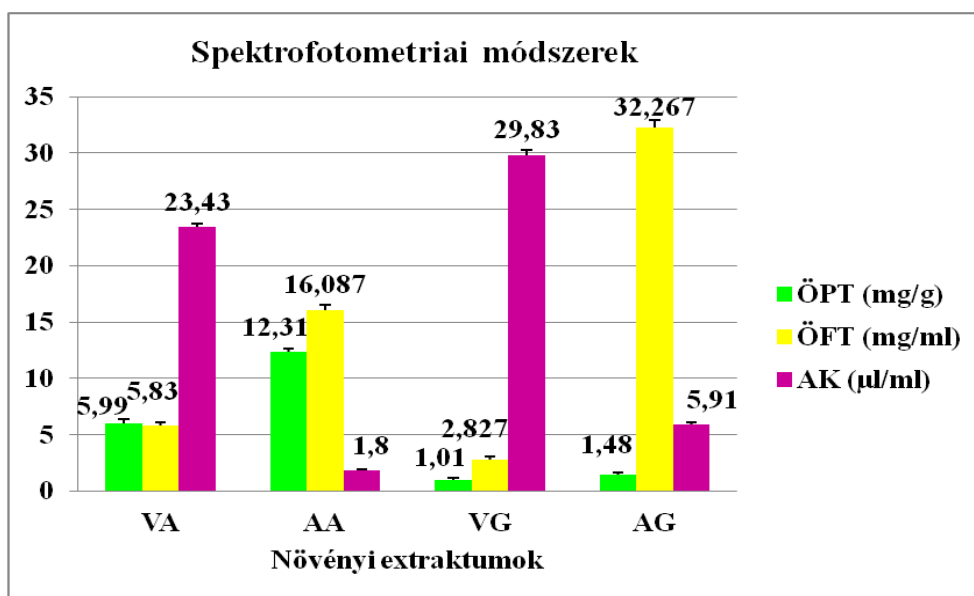
Mielőtt ezt a kérdést megválaszolnám, fontosnak tartottam, hogy további információkat nyerjek a vizsgált articsóka és görögszéna kivonatok összpolicifol-, összflavonoid- és összantocianin tartalmaira, illetve az extraktumok *in vitro* antioxidáns kapacitásaira vonatkozóan.

Az articsókának és a görögszénának számos fontos élettani hatást tulajdonítanak, melyek egy részét éppen az antioxidáns kapacitásukkal kapcsolatos policifol tartalmukkal magyarázzák. A policifolok között is kiemelkedő jelentőségűek a flavonoidok. Azonban a flavonoidok nemcsak antioxidáns jelleggel bírnak, hanem – az egyik csoportjuknak, az antocianinoknak – fontos szerepet játszanak a gyulladások megelőzésében és csökkentésében. A szárított articsóka levélből, illetve a hazai görögszénamagból készített vizes és alkoholos extraktumokban meghatároztam – az Anyag és módszer fejezetben leírtaknak megfelelően – a policifolok, a flavonoidok és az antocianinok mennyiségét. Ezzel párhuzamosan vizsgáltam a szárított articsóka levélből, illetve a hazai görögszénamagból készített vizes és alkoholos extraktumokra jellemző *in vitro* antioxidáns kapacitásokat, amit az Anyag és módszer fejezetben szintén ismertettem. Az eredményeket az alábbi 25. táblázatban foglaltam össze.

25. táblázat: Az articsóka és a görögszéna extraktumok polifenol specifikus paramétere

Extraktum paraméter	Vizes articsóka	Alkoholos articsóka	Vizes görögszéna	Alkoholos görögszéna
Összpolifenol-tartalom (mg/g)	5,99±0,36	12,31±0,34	1,01±0,15	1,48±0,12
Összflavonoid-tartalom (mg/ml)	5,830±0,31	16,087±0,39	2,827±0,22	32,267±0,61
Σ (polifenol, flavonoid, kumarin) (UHPLC-ESI-MS által azonosított vegyületek (db))	(9+9) 18	(3+16) 19	(1+7) 8	(2+17) 19
Antioxidáns kapacitás (µl/ml)	23,43±0,25	1,80±0,16	29,83±0,41	5,91±0,18
Összantocianin-tartalom (mg/l)	0	0	0	0

Az eredmények érdekes polifenol specifikus mennyiségi sajátosságokra utalnak (12. ábra). Az összpóifenol tartalmat illetően az articsóka extraktumokban sokkal nagyobb mennyiségű polifenol található, mint a görögszénában. Másfelől mind az articsóka, mind a görögszéna esetében az alkoholos extraktumokban volt nagyobb a polifenolok mennyisége.



12. ábra: A spektrofotometriai módszerek: ahol, (VA) vizes articsóka; (AA) alkoholos articsóka; (VG) vizes görögszéna; (AG) alkoholos görögszéna; (AK) antioxidáns kapacitás; (ÖFT) összflavonoid-tartalom; (ÖPT) összpolicifol-tartalom.

Ugyanezek a tendenciák állapíthatók meg az összflavonoid tartalomra vonatkozóan is. Amennyiben igaz az a feltevés, hogy az összpolicifol és összflavonoid tartalmak egyenesen arányosak a kérdéses extraktumok *in vitro* körülmények között mért antioxidáns kapacitásával, úgy ez utóbbinak is követnie kell az összpolicifolra és az összflavonoidra jellemző tendenciákat. Azonban, nem a várt eredményeket kaptam, hanem azokkal ellentétben a vizes növényi extraktumokban figyelhettem meg a magasabb *in vitro* antioxidáns kapacitást az adott növény alkoholos extraktumához viszonyítva. Az articsóka vizes extraktuma közel tizenhatszor-, míg a görögszéna vizes extraktuma ötször magasabb *in vitro* antioxidáns kapacitást mutatott a megfelelő alkoholos extraktumokhoz viszonyítva. Tehát az összpolicifol és összflavonoid tartalom alacsonyabb a vizes articsóka és görögszéna kivonatokban, mégis az *in vitro* antioxidáns kapacitás mutat magasabb értékeket ezekben a kivonatokban.

Másfelől, amennyiben azt vizsgálom extraktumonként, hogy az UHPLC-ESI-MS rendszer által beazonosított policifol és flavonoid típusú bioaktív hatóanyagok száma miként arányul az *in vitro* antioxidáns kapacitáshoz, akkor kimutatható, hogy a kevesebb számú bioaktív hatóanyagot tartalmazó vizes extraktumok esetében magasabb az *in vitro* antioxidáns kapacitás (25. táblázat). Tehát a kisebb koncentrációjú és kevesebb komponensű policifol és flavonoid tartalmú vizes articsóka-, illetve görögszéna kivonatoknak van magasabb *in vitro* antioxidáns aktivitása. Ezért arra a megállapításra

jutottam, hogy az articsóka és görögszéna vizes extraktumokon – a polifenol-, valamint a flavonoid-tartalmon túl – még lennie kell olyan bioaktív hatóanyag(ok)nak, amely(ek)et az UHPLC-ESI-MS rendszerrel nem sikerült azonosítani, ám azok aktivitása jelentős mértékben hozzájárul az *in vitro* körülmények között mért antioxidáns kapacitáshoz.

Fontos eredménynek számít az is, hogy a vizsgált növényi extraktumokban nem sikerült antocianinokat találni a mennyiségi analízisek kapcsán. Ez pedig összhangban van az extraktumok minőségi összetételére vonatkozó UHPLC-ESI-MS vizsgálatok során kapott eredményekkel, hiszen ez utóbbi vizsgálatok esetében sem sikerült antocianin típusú bioaktív hatóanyagokat (pl. pelargonidin, cianidin, delphinidin, petunidin, malvidin) beazonosítani.

5.4. Az articsóka és a görögszéna extraktumok hatásainak *in vivo* tesztelése *Drosophila melanogaster*-en

5.4.1. Az articsóka és a görögszéna extraktumok hatása az *ecetmuslica* életképességére

Annak érdekében, hogy megvizsgáljam a lehetséges toxikus hatását az articsóka- és görögszéna vizes-, illetve alkoholos kivonatoknak *Drosophila melanogaster* alapú *in vivo* tesztrendszerrel alkalmaztam. A módszer lényegében azzal kapcsolatos, hogy a különféle koncentrációjú kivonatokkal kezelem a meghatározott genotípusú *ecetmuslicákat* lárvális állapotban, majd meghatározom a túlélési képességet, viszonyítva a kikelt F1-es imágók számát, a kísérletnek alávetett embriók és lárvák számához. Ilyen értelemben az embriókra vonatkoztatott F1 imágó kikelési arány egyértelműen az alkalmazott extraktum *muslica* életképességet befolyásoló hatására utal.

A kísérletek során vizsgáltam a tömény és a hígított (10^{-1} , 10^{-2}) kivonatok esetleges koncentráció függő hatását. A fentiekben említett extraktumok hígításait kétféle keresztezést alkalmazva teszteltem annak érdekében, hogy az esetleges genotípus-függő hatásokra is fény derüljön. Az egyik keresztezésben w^{m4h} genotípusú szülőket kereszteztem, míg a másik keresztezésben olyan szülői párt alkalmaztam, amelyeket a genotoxicitási vizsgálatban is használtam. Ezzel a kísérleti megoldással külön kívántam választani az articsóka- és a görögszéna extraktumok feltételezett citotoxikus és genotoxikus hatásainak *in vivo* vizsgálatát (26. táblázat).

26. táblázat: Az articsóka extraktum, ecetmuslica életképességet befolyásoló hatása. Kontroll kísérletek adatait sárga színnel, a vizes extraktumra vonatkozó adatokat zölddel, míg az alkoholos extraktumos adatokat kékkel jelöltem. Az ecetmuslica túlélési arány a kikelt imágókra és a kezelt embriókra vonatkozik. A Kontroll-NM a normál táptalajt, míg a Kontroll-DIM az instant táptalajt jelöli.

Szülői keresztezés	Kezelés	Σ F1 kezelt embrió	F1 báb	Kikelt F1 imágó	F1 túlélési arány (%)	Átlagos F1 túlélési gyakoriság (%)
♀ <i>w^{m4h}</i> x ♂ <i>w^{m4h}</i>	Kontroll-NM	1000	972	956	95,6	95,2
	Kontroll-DIM	1000	988	952	95,2	
	Vizes articsóka törzsoldat	1000	968	962	96,2	
	Vizes articsóka 1:10 hígítás	1000	957	952	95,2	93,8
	Vizes articsóka 1:100 hígítás	1000	972	944	94,4	
	Alkoholos articsóka törzsoldat	1000	958	949	94,9	
	Alkoholos articsóka 1:10 hígítás	1000	977	932	93,2	
	Alkoholos articsóka 1:100 hígítás	1000	968	936	93,4	
♀ <i>mwh/mwh</i> x ♂ <i>flr³/TM2, Ubx</i>	Kontroll-NM	1000	984	961	96,1	95,9
	Kontroll-DIM	1000	982	966	96,6	
	Vizes articsóka törzsoldat	1000	966	951	95,1	
	Vizes articsóka 1:10 hígítás	1000	982	964	96,4	95,1
	Vizes articsóka 1:100 hígítás	1000	975	963	96,3	
	Alkoholos articsóka törzsoldat	1000	977	943	94,3	
	Alkoholos articsóka 1:10 hígítás	1000	988	95	96,5	
	Alkoholos articsóka 1:100 hígítás	1000	968	945	94,5	

27. táblázat: A görögszéna extraktum, ecetmuslica életképességet befolyásoló hatása. Kontroll kísérletek adatait sárgával, vizes extraktumra vonatkozó adatokat zölddel, míg az alkoholos extraktumos adatokat kékkel jelöltem. Az ecetmuslica túlélési arány, a kikelt imágókra és a kezelt embriókra vonatkozik. A Kontroll-NM a normál táptalajt, míg a Kontroll-DIM az instant táptalajt jelöli.

Szülői keresztezés	Kezelés	Σ F1 kezelt embrió	F1 báb	Kikelt F1 imágó	F1 túlélési arány (%)	Átlagos F1 túlélési arány (%)
♀ _{w^{m4h}} x ♂ _{w^{m4h}}	Kontroll NM	1000	968	956	95,6	94,5
	Kontroll DIM	1000	972	944	94,4	
	Vizes görögszéna törzsoldat	1000	946	938	93,8	93,3
	Vizes görögszéna 1:10 hígítás	1000	953	942	94,2	
	Vizes görögszéna 1:100 hígítás	1000	972	957	95,7	
	Alkoholos görögszéna törzsoldat	1000	948	926	92,6	91,9
	Alkoholos görögszéna 1:10 hígítás	1000	966	947	9,7	
	Alkoholos görögszéna 1:100 hígítás	1000	952	928	92,8	
♀ _{mwh/mwh} x ♂ _{flr³/TM2, Ubx}	Kontroll NM	1000	938	912	91,2	92,6
	Kontroll DIM	1000	942	921	92,1	
	Vizes görögszéna törzsoldat	1000	947	922	92,2	91,9
	Vizes görögszéna 1:10 hígítás	1000	966	941	94,1	
	Vizes görögszéna 1:100 hígítás	1000	933	916	91,6	
	Alkoholos görögszéna törzsoldat	1000	955	932	93,2	92,1
	Alkoholos görögszéna 1:10 hígítás	1000	934	917	91,7	
	Alkoholos görögszéna 1:100 hígítás	1000	943	921	92,1	

Az ilyenfajta ecetmuslicára alapozott *in vivo* kísérleti rendszerben feltételezhető, hogy minél citotoxikusabb egy növényi kivonat annál inkább képes lesz csökkenteni az F1 utódok életképességét. Az állítás fordítottja is igaznak mondható, vagyis amennyiben az extraktum nem befolyásolja a kezelt egyedek életképességét úgy a citotoxikus hatásával sem kell számolni. Az ecetmuslica életképességi vizsgálatok kísérleti menetét az Anyag és módszer fejezetben ismertettem. A kétféle keresztezéssel és növényi extraktumokkal végzett kísérleti eredményeket a 26.-27. táblázatokban mutatom be.

A 26. táblázatban feltüntetett adatokból kiderül, hogy a vizes és alkoholos articsóka kivonatok – úgy tömény mint hígított formában – nem befolyásolják a kétféle keresztezésből származó F1 utódok életképességét, azaz nincs *Drosophila melanogaster*-en detektálható citotoxikus hatásuk.

A 27. táblázatban feltüntetett adatokból kiderül, hogy a vizes és alkoholos görögszéna kivonatok – úgy tömény mint hígított formában – nem befolyásolják a kétféle keresztezésből származó F1 utódok életképességét, azaz nincs *Drosophila melanogaster*-en detektálható citotoxikus hatásuk.

5.4.2. Az articsóka és a görögszéna extraktumok genotoxikus hatásának jellemzése SMART tesztrendszerrel

Miután azt tapasztaltam, hogy az articsóka és a görögszéna kivonatok – úgy tömény mint hígított formában – nem befolyásolták kedvezőtlenül a *Drosophila melanogaster* életképességét, megvizsgáltam, hogy befolyásolják-e a szomatikus kromoszóma és/vagy gén mutációkat. Az utóbbi időben bizonyítást nyert az a tény, hogy hatóanyagok nem-citotoxikus koncentrációban is képesek mutációkat indukálni (Hodjat *et al.*, 2017; Marabini *et al.*, 2011; Cabaton *et al.*, 2009). Nem általánosan elterjedt jelenségről van szó, ám ha egy non-toxikus hatóanyagról kiderül, hogy genotoxikus hatással rendelkezik, akkor számolni kell a karcinogén hatásával is. A vizes- és alkoholos articsóka, illetve görögszéna kivonatok potenciális genotoxikus hatását a *Drosophila melanogaster* SMART tesztrendszer segítségével analizáltam, amint azt az Anyag és módszer fejezetben ismertettem.

Valójában az ♀ *mwh/mwh* x ♂ *flr³/TM2, Ubx* keresztezésből származó F1 lárvakat kezeltem a tömény kivonatokkal, majd a kikelt imágókat fenotípusuk alapján osztályoztam és szárny preparátumokat készítettem. Elsőként a kettős transzheterozigóta *mwh, +/+*, *flr³* F1 utódok szárnyait tanulmányoztam és az iker-, illetve magányos mozaik sejtklónok előfordulását vizsgáltam. Az eredményeket a 28. táblázatban mutatom be.

28. táblázat: A mozaik sejtklónok indukciójának gyakorisága az *mwh, +/+*, *flr* ecetmuslicák szárnyain. Kontroll kísérletek adatait sárgával, az articsóka adatait zölddel, míg a görögszéna adatait barna színnel emeltem ki.

Kezelés	Szárny (db) (N)	Mozaik sejtklón				Mozaik sejtklón gyakoriság (n/N)	Mozaik sejtklón mérete sejt/klón (m)	Mozaik sejtklón indukció gyakorisága (f=nm/NC)
		iker	magányos		összes (n)			
			<i>mwh</i>	<i>flr</i>				
Kontroll	107	3	55	1	59	0,55	1,1±0,2	2,0 x 10 ⁻⁵
Vizes articsóka	98	5	51	-	56	0,57	1,2±0,4	2,3 x 10 ⁻⁵
Alkoholos articsóka	106	4	53	1	58	0,55	1,1±0,4	2,0 x 10 ⁻⁵
Vizes görögszéna	135	5	53	3	61	0,49	1,6±0,4	2,4 x 10 ⁻⁵
Alkoholos görögszéna	142	6	54	5	65	0,46	1,4±0,6	2,1 x 10 ⁻⁵

Tekintettel a mozaik sejtklónok gyakoriságára, átlagos méretére, valamint a mozaik sejtklónok indukciójának gyakoriságára kijelenthető, hogy nincsenek számottevő különbségek a kezeletlen és a különböző vizes-, illetve alkoholos extraktumokkal kezelt kettős transzheterozigóta *mwh, +/+*, *flr³* egyedek szárnyaira vonatkozó adatok között. Ezek az adatok azt is jelzik, hogy a vizes- és az alkoholos articsóka, illetve görögszéna extraktumok nem indukálnak kromoszómatörés típusú mutációkat magasabb gyakorisággal, mint összehasonlítva az a kezeletlen ecetmuslicák esetében megfigyelhető.

Az ♀ *mwh/mwh* x ♂ *flr³/TM2, Ubx* keresztezésből származó *mwh, +/+*, *flr³* egyedekkel azonos arányban kell keletkezniük az *mwh/TM2, Ubx* transzheterozigóta utódoknak is. Ez utóbbi F1 egyedek szárnyait tanulmányoztam és a magányos *mwh* mozaik sejtklónok előfordulását vizsgáltam. Az eredményeket a 29. táblázatban mutatom be.

29. táblázat: A mozaik sejtklónok indukciójának gyakorisága az *mwh/TM2*, *Ubx* ecetmuslicák szárnyain. Kontroll kísérletek adatait sárgával, az articsóka kezelés adatait zölddel, míg a görögszéna adatait barna színnel emeltem ki.

Kezelés	Szárny (N)	mwh mozaik sejtklón (n)	Mozaik sejtklón gyakoriság (n/N)	Mozaik sejtklón mérete sejt/klón (m)	Mozaik sejtklón indukció gyakorisága (f=2nm/NC)
Kontroll	106	11	0,1	2,4 ± 1,6	1,6 x 10 ⁻⁵
Vizes articsóka	114	12	0,1	2,2 ± 1,2	1,5 x 10 ⁻⁵
Alkoholos articsóka	102	11	0,1	2,4 ± 1,4	1,7 x 10 ⁻⁵
Vizes görögszéna	112	12	0,11	2,4 ± 0,8	1,7 x 10 ⁻⁵
Alkoholos görögszéna	116	14	0,12	2,2 ± 0,6	1,8 x 10 ⁻⁵

Tekintettel a mozaik sejtklónok gyakoriságára és átlagos méretére, valamint a mozaik sejtklónok indukciójának gyakoriságára kijelenthető, hogy nincsenek számottevő különbségek a kezeletlen és a különböző vizes-, illetve alkoholos extraktumokkal kezelt transzheterozigóta *mwh/TM2*, *Ubx* egyedek szárnyaira vonatkozó adatok között. Ezek az adatok azt is jelzik, hogy úgy a vizes mint az alkoholos articsóka- és görögszéna extraktumok nem indukálnak génmutációkat magasabb gyakorisággal, mint összehasonlítva az a kezeletlen ecetmuslicák esetében is megfigyelhető.

5.5. Az articsóka és a görögszéna extraktumok hatásainak *in vitro* tesztelése humán emlőkarcinoma sejtvonalakon

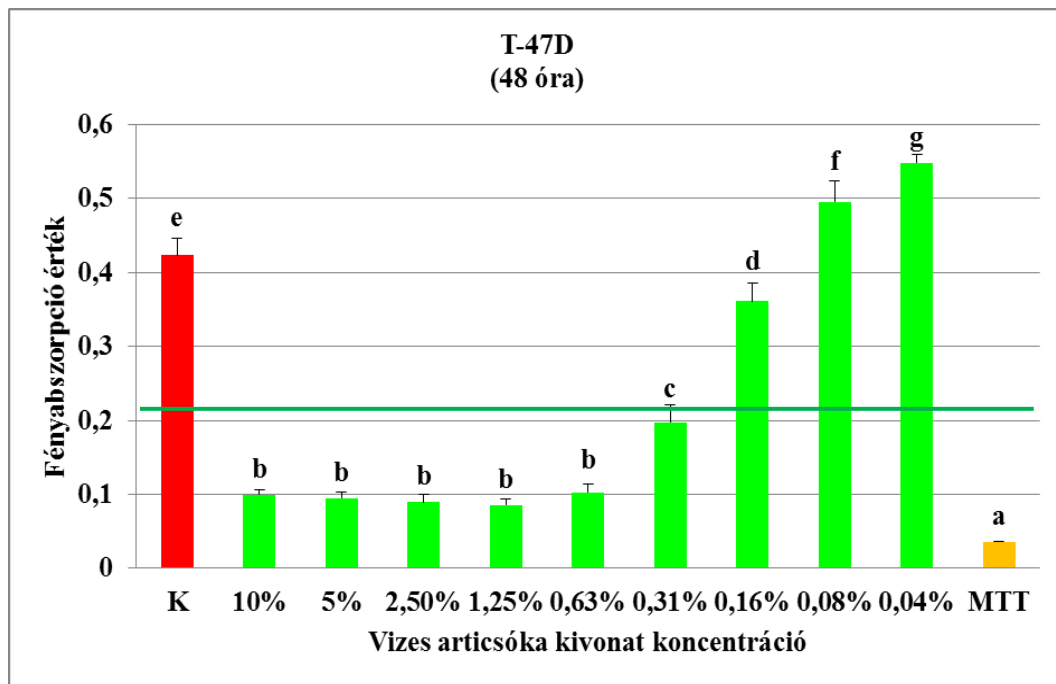
A görögszéna és az articsóka kivonataim humán mellrák sejtekre gyakorolt hatásainak analizálása érdekében a T-47D és a ZR-75-1 sejtvonalakat vizsgáltam. A T-47D sejtvonalat a mellráksejtvonal luminális A altípusának határozták meg, ami hormonfüggő (ösztrogén receptor expresszió) és gyakran nagyfokú érzékenységet mutat a kemoterápiára (Holliday és Speirs, 2011). A ZR-75-1 a mellráksejtvonal luminális B altípusba sorolható, ami általában hormonfüggő és némi variabilitást mutat a kemoterápia érzékenység tekintetében. A két vizsgált sejtvonal genetikailag nem identikus. Genomikai különbségként feljegyezték, hogy a ZR-75-1 sejtek a normális p53 allélt hordozzák, míg a T-47D sejtekben a p53 gén egy mutáns allélja fejeződik ki (Huovinen *et al.*, 2011). A ZR-75-1 sejtekről kimutatták, hogy a normál BRCA1/2 allélt tartalmazzák (Gilardini Montani *et al.*, 2013), míg a T-47D sejtvonal esetében csak indirekt bizonyítékok

támasztják alá a normál BRCA1/2 allélok jelenlétét. Ugyancsak kimutatták, hogy a hMAT gén expresszió egy tízszeres emelkedést mutat a T-47D sejtekben, összehasonlítva a ZR-75-1 sejtekben detektált normál expressziós szintekkel (Bandyopadhyay *et al.*, 1996). Ezek a kísérleti adatok azt mutatják, hogy a T-47D és a ZR-75-1 sejtvonalakat a mellrák különböző altípusainak lehet tekinteni, melyeknek különböző prognózisuk és terápiás érzékenységük van.

Az emlőtumoros sejtek (T-47D, ZR-75-1) életképességére, illetve proliferációjára irányuló kísérleteimet MTT teszt segítségével végeztem. A daganatos sejteket az articsóka- és a görögszéna extraktumokkal eltérő koncentrációkban (10-0,04 v/v%) kezeltem, mint azt az Anyag és módszer fejezetben ismertettem. Az egyes kezelések 48 illetve 72 óráig tartottak. A három, egymástól független kísérlet eredményeinek értékelését a kezelt sejtvonalak, a különböző kivonatok és a kezelés időtartamának viszonyában értelmeztem (13.-24. és 26.-29. ábra). Az ábrák egyes oszlopain látható eltérő betűjelzések szignifikáns különbséget mutatnak, míg az azonos betűjelzéssel ellátott oszlopok között nincs szignifikáns eltérés. A diagramokon feltüntetett zöld vonal a kontroll (kezeletlen) sejtek hipotetikus 50%-os életképességét jelöli.

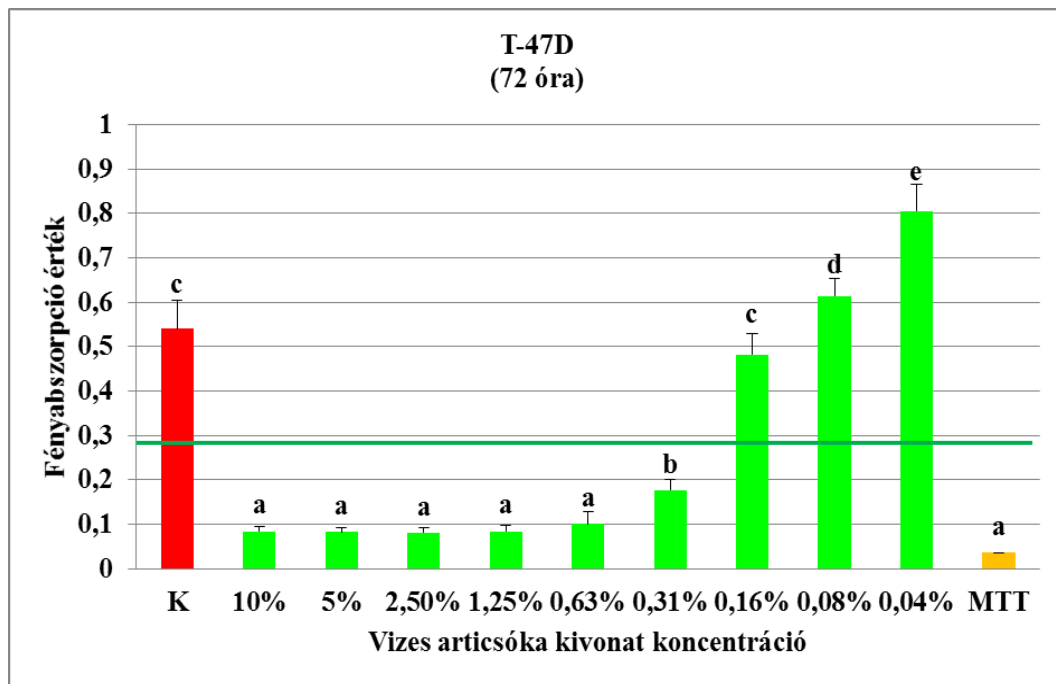
5.5.1. A vizes articsóka extraktum sejtvonalak életképességére gyakorolt hatása

A T-47D humán emlőkarcinóma sejteket kezeltem 48 és 72 órán át különböző koncentrációjú vizes articsóka extraktummal, majd a kezelést követően elvégzett MTT teszt során mért abszorbancia érték alapján következtettem a kezelést túlélő sejtek számára. A T-47D sejtvonalon és eltérő koncentrációjú vizes articsóka extraktummal végzett kísérletek eredményei a következő 13. és 14. ábrákon láthatók.



13. ábra: A vizes articsóka kivonat hatása a T-47D emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 48 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

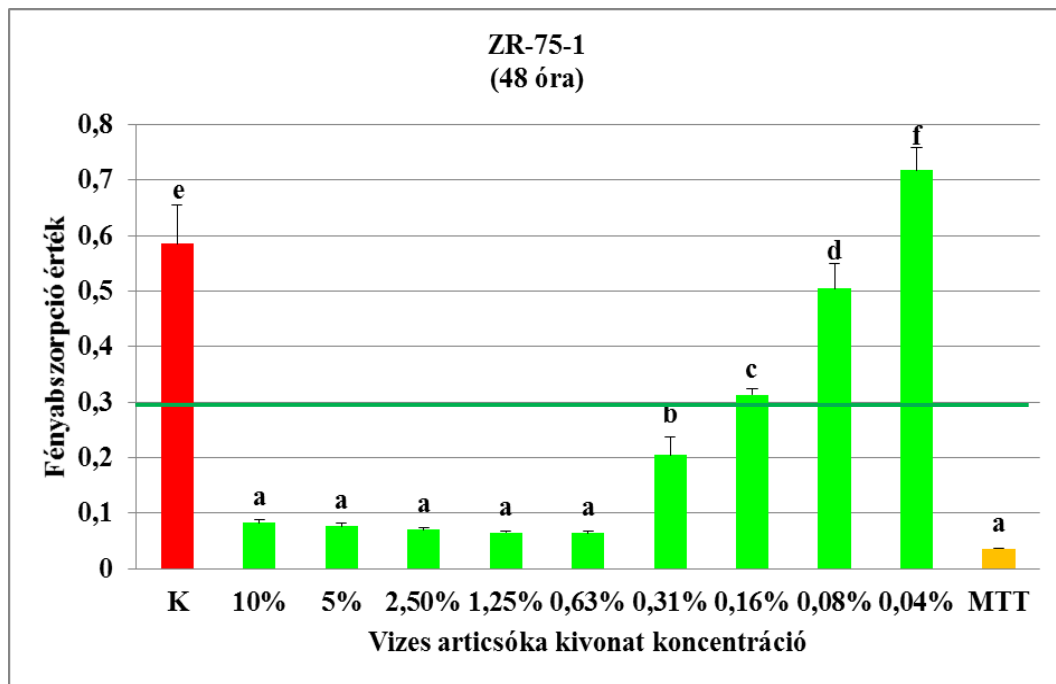
A T-47D sejtvonalon történt vizes articsóka kivonat különböző koncentrációjú és 48 órás alkalmazása során kitűnik, hogy a 10-0,63% koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása jelentősen lecsökken (13. ábra). Azonban a 0,31-0,04%-os koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása nő, és a 0,08-0,04% extraktum koncentrációk a kontrollt meghaladó mértékben növelik meg a kezelt sejtek életképességét, ami akár sejtszámbeli növekedést is jelenthet. A fentiekben leírt kezelési profil mindenképpen a koncentráció-függő bifázisos élettani hatásra emlékeztet, azaz magasabb koncentrációban egy gátló, míg alacsonyabb koncentrációban egy serkentő élettani hatást detektáltam.



14. ábra: A vizes articsóka kivonat hatása a T-47D emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 72 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

A T-47D sejtvonalon történt vizes articsóka kivonat különböző koncentrációjú és 72 órás alkalmazása során, a már korábban, a 48 órás kezelés során leírt bifázisos élettani hatást észleltem (14. ábra). Úgy tűnik, hogy a két (48 és 72 órás) időtartamú kezelés közötti különbség csak a 0,08-0,04% koncentrációjú tartományban jelentkezik, melynek sejtszámbeli növekedés lehet az alapja.

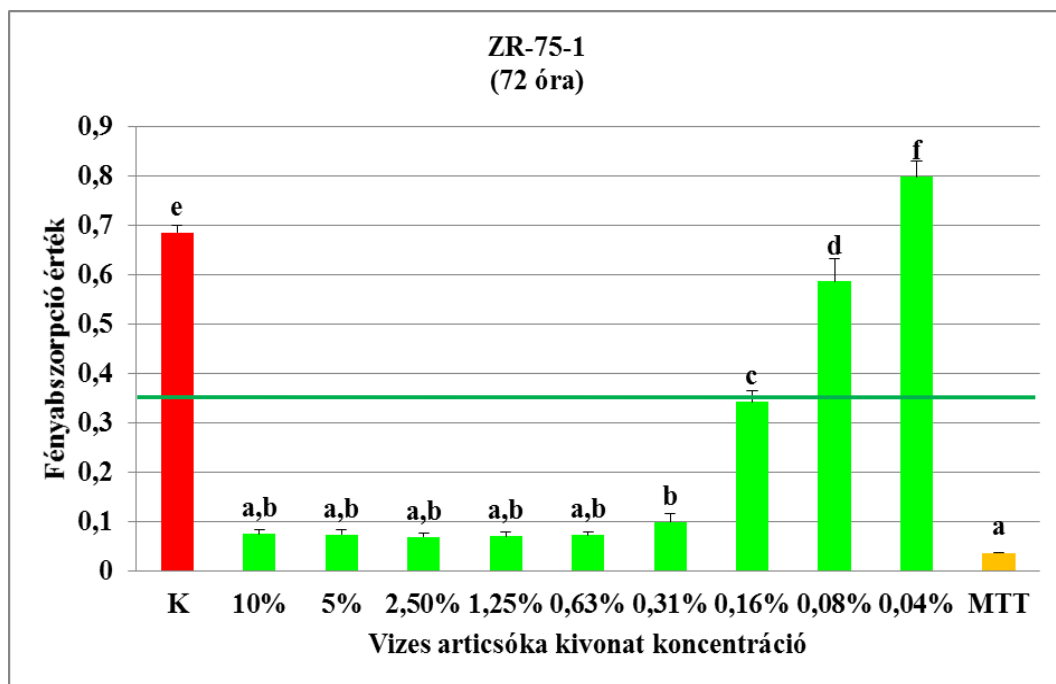
A T-47D sejtvonalat követően a ZR-75-1 humán emlőkarcinoma sejteket kezeltem 48 és 72 órán át különböző koncentrációjú vizes articsóka extraktummal, majd a kezelést követően elvégzett MTT teszt kapcsán mért fényabszorpció értékek alapján következtettem a kezelést túlélő sejtek számára. A ZR-75-1 sejtvonalon a különféle koncentrációjú vizes articsóka extraktummal elvégzett kísérletek eredményei a következő 15. és 16. ábrákon láthatók.



15. ábra: A vizes articsóka kivonat hatása a ZR-75-1 emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 48 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

A ZR-75-1 sejtvonalon a vizes articsóka kivonat különböző koncentrációjú és 48 órás alkalmazása során kitűnik, hogy a 10-1,25% koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása jelentősen lecsökken (15. ábra). Azonban a 0,31-0,04%-os koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása elkezd növekedni, és a 0,04% extraktum koncentráció a kontrollt meghaladó mértékben megnöveli a kezelt sejtek életképességét, ami akár sejtszámbeli növekedést is jelenthet. A fentiekben leírt kezelési profil újfent koncentráció-függő bifázisos élettani hatásra emlékeztet, úgy mint azt a T-47D sejtvonal esetében tapasztaltam.

A ZR-75-1 sejtvonalon a vizes articsóka kivonat különböző koncentrációjú és 72 órás alkalmazásakor a korábbi 48 órás kezelés során leírt bifázisos élettani hatást észleltem (16. ábra). A 0,31% koncentrációnál a 48 órás kezelésnél már detektálható a kezelt sejtek számának a növekedése, míg a 72 órás kezelés esetében továbbra is a gátló hatás látszik érvényesülni. A 0,16-0,04% koncentrációjú tartományban jelentkezik a sejtek viabilitásának növekedése, és 0,04% extraktumban haladja meg a sejtek viabilitása a kontrollét. Ez utóbbinak újfent a sejtek számának a növekedése lehet az alapja.

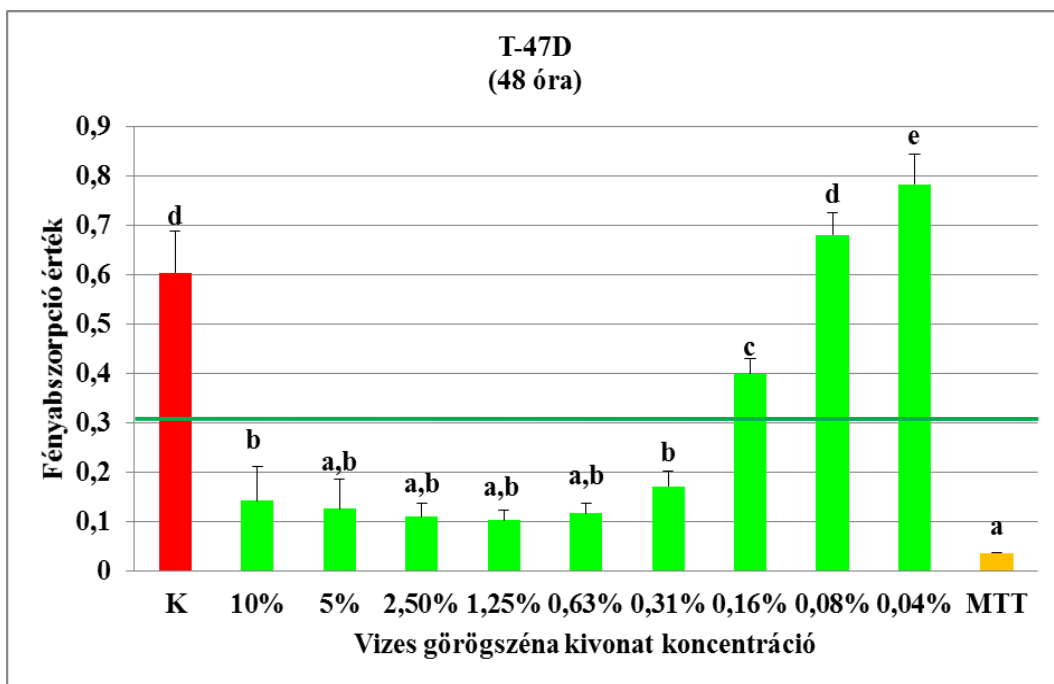


16. ábra: A vizes articsóka kivonat hatása a ZR-75-1 emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 72 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

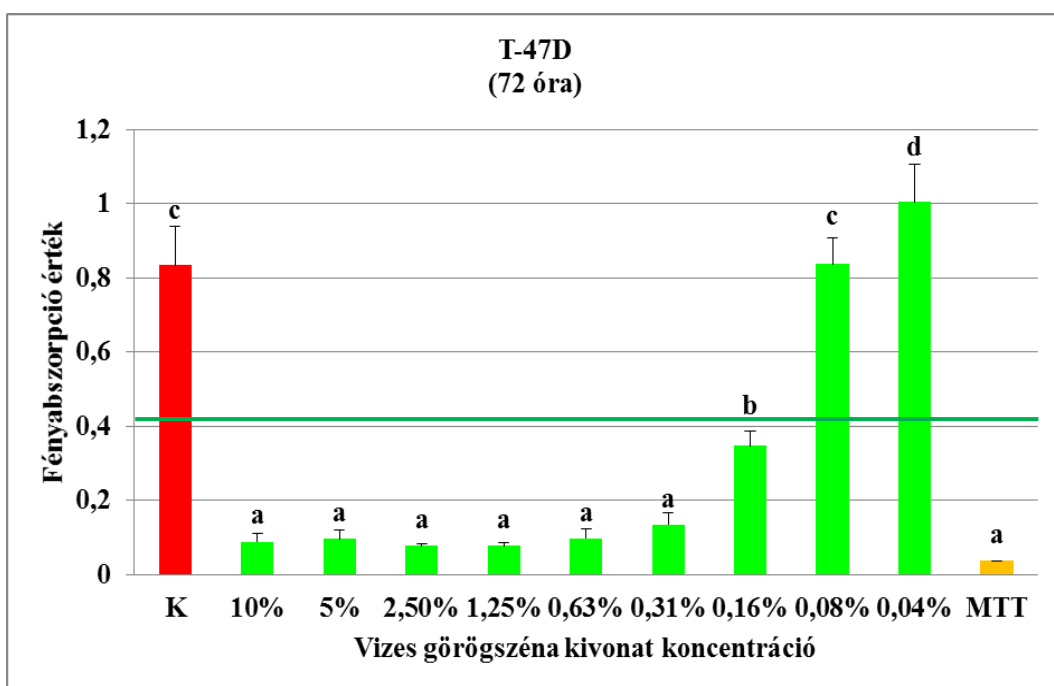
5.5.2. A vizes görögszéna extraktum sejtvonalak életképességére gyakorolt hatása

A T-47D humán emlőkarcinoma sejteket kezeltem 48 és 72 órán át különböző koncentrációjú vizes görögszéna extraktummal, majd a kezelést követően elvégzett MTT teszt során mért abszorbancia érték alapján következtettem a kezelést túlélő sejtek számára. A T-47D sejtvonalon és a különböző koncentrációjú vizes görögszéna extraktummal végzett kísérletek eredményei a következő 17. és 18. ábrákon láthatók.

A különféle koncentrációjú és 48 órás kezelés során kitűnik, hogy a 10-0,31% koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása jelentősen lecsökkent (17. ábra). Azonban a 0,16-0,04%-os koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása elkezd növekedni, és a 0,08-0,04% extraktum koncentrációk a kontrollt meghaladó mértékben növelik meg a kezelt sejtek életképességét, ami akár sejtszámbeli növekedést (proliferációt) is jelenthet.



17. ábra: A vizes görögszéna kivonat hatása a T-47D emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 48 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.



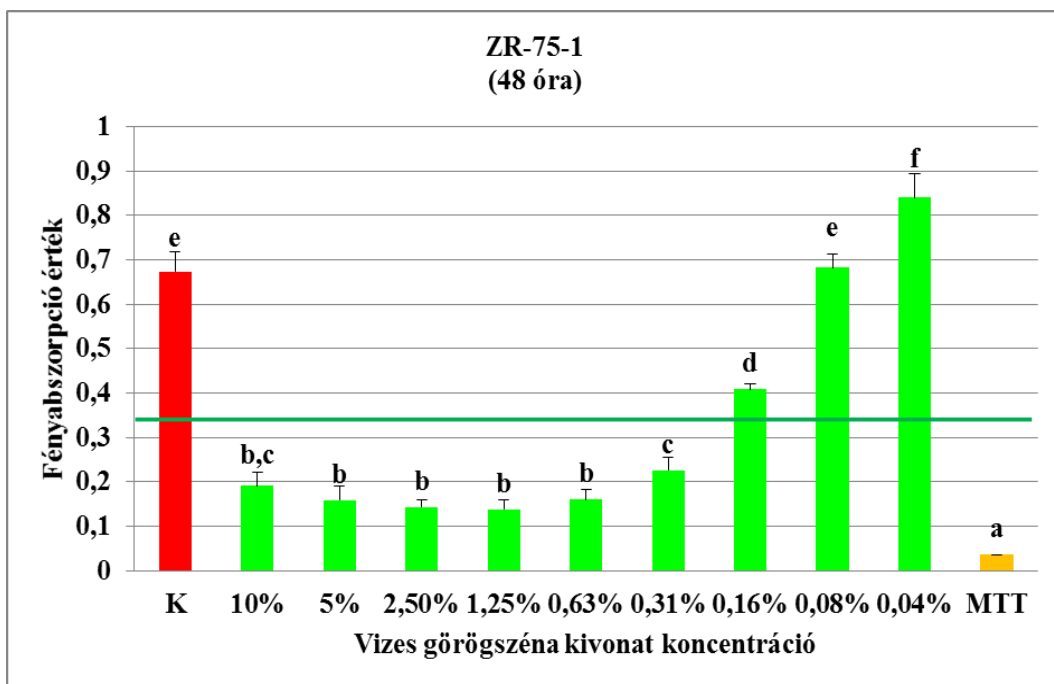
18. ábra: A vizes görögszéna kivonat hatása a T-47D emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 72 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

A fentiekben leírt kezelési profil olyan koncentráció-függő bifázisos élettani hatásra utal, amelynél a magasabb koncentrációban egy gátló-, míg az alacsonyabb koncentrációban egy életképességet/proliferációt növelő hatás érvényesül.

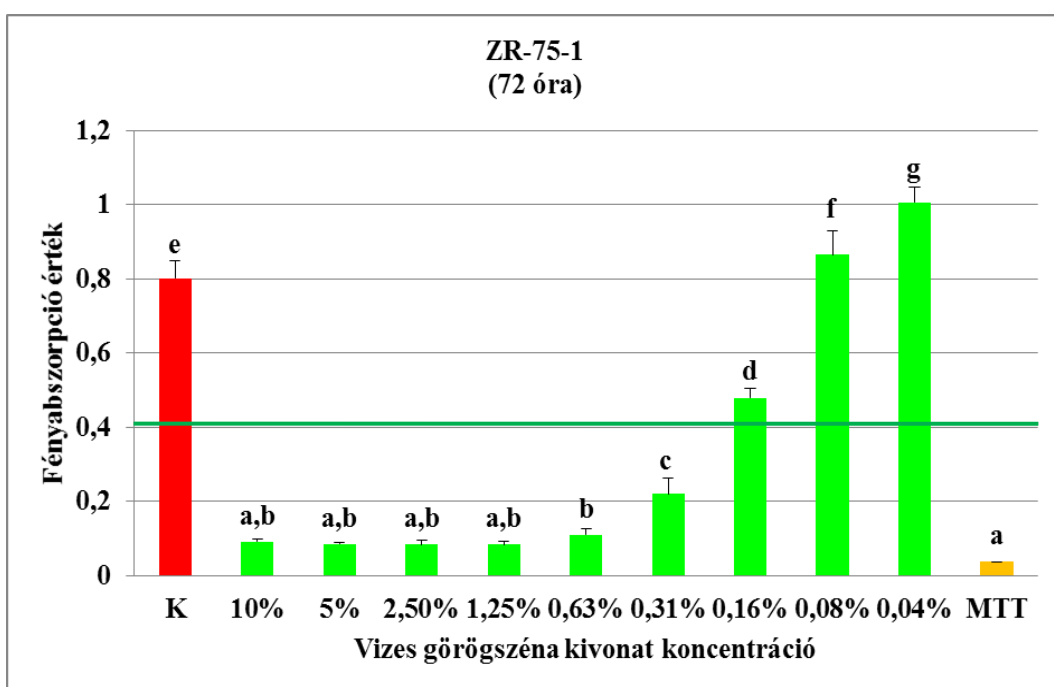
A T-47D sejtvonalon a vizes görögszéna kivonat különböző koncentrációjú és 72 órás alkalmazása során, a már korábban, a 48 órás kezelés során leírt bifázisos élettani hatást észleltem (18. ábra). A 48 és 72 órás időtartamú kezelések között nincs lényegi különbség, csak a kontroll és a 0,08 – 0,04%-os koncentrációk esetében figyelhetők meg magasabb abszorbancia értékek, amelynek alapja lehet a relatív sejtszámnövekedés is.

A T-47D sejtvonalat követően, a ZR-75-1 humán emlőkarcinoma sejteket is kezeltem 48 és 72 órán át különböző koncentrációjú vizes görögszéna extraktummal, majd a kezelést követően elvégzett MTT teszt során mért abszorbancia értékek alapján következtettem a kezelést túlélő sejtek számára. A ZR-75-1 sejtvonalon és a különböző koncentrációjú vizes articsóka extraktummal végzett kísérletek eredményei a következő 19. és 20 ábrákon láthatók.

A ZR-75-1 sejtvonalon a vizes görögszéna kivonat különböző koncentrációjú és 48 órás alkalmazása során kitűnik, hogy a 10-0,31% koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása alacsony (19. ábra). Azonban a 0,16-0,04%-os koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása elkezd növekedni, és a 0,04% extraktum koncentrációban a kontrollt meghaladó mértékben megnövekedik a kezelt sejtek életképessége, ami újfent akár sejtszámbeli, azaz proliferációs növekedést is jelenthet. A fentiekben leírt kezelési profil a koncentráció-függő bifázisos élettani hatásra emlékeztet, mint azt a T-47D sejtvonál esetében már tapasztaltam.



19. ábra: A vizes görögszéna kivonat hatása a ZR-75-1 emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 48 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

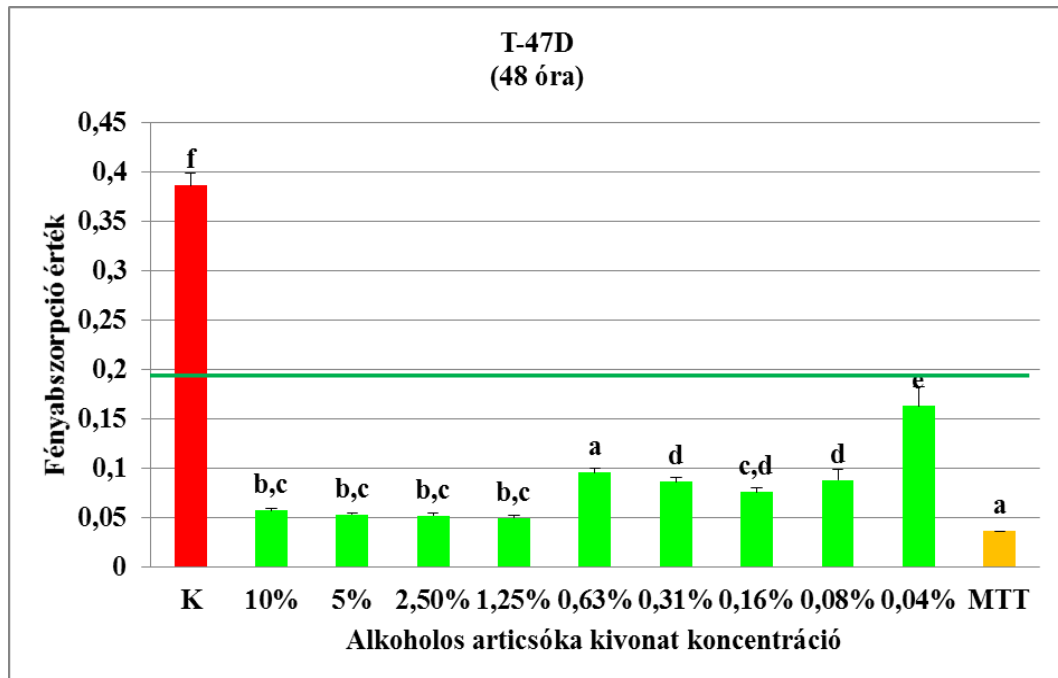


20. ábra: A vizes görögszéna kivonat hatása a ZR-75-1 emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 72 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

A ZR-75-1 sejtvonalon a vizes görögszéna kivonat különböző koncentrációjú és 72 órás alkalmazásakor a korábbi 48 órás kezelés során leírt bifázisos élettani hatást észleltem (20. ábra). A 0,31% koncentrációjú 48 órás kezelésnél továbbra is a gátló hatás érvényesült, míg a 72 órás kezelés esetében már detektálható a kezelt sejtek számának a növekedése. A 72 órás kezelés során (hasonlóan a 48 órás kezeléshez) a 0,16-0,04% koncentrációjú tartományban jelentkezik a sejtek viabilitásának növekedése, a 0,02%-0,04%-os extraktumban a sejtek viabilitása meghaladja a kontrollét, amelynek alapja lehet a sejtproliferáció is.

5.5.3. Az alkoholos articsóka extraktum sejtvonalak életképességére gyakorolt hatása

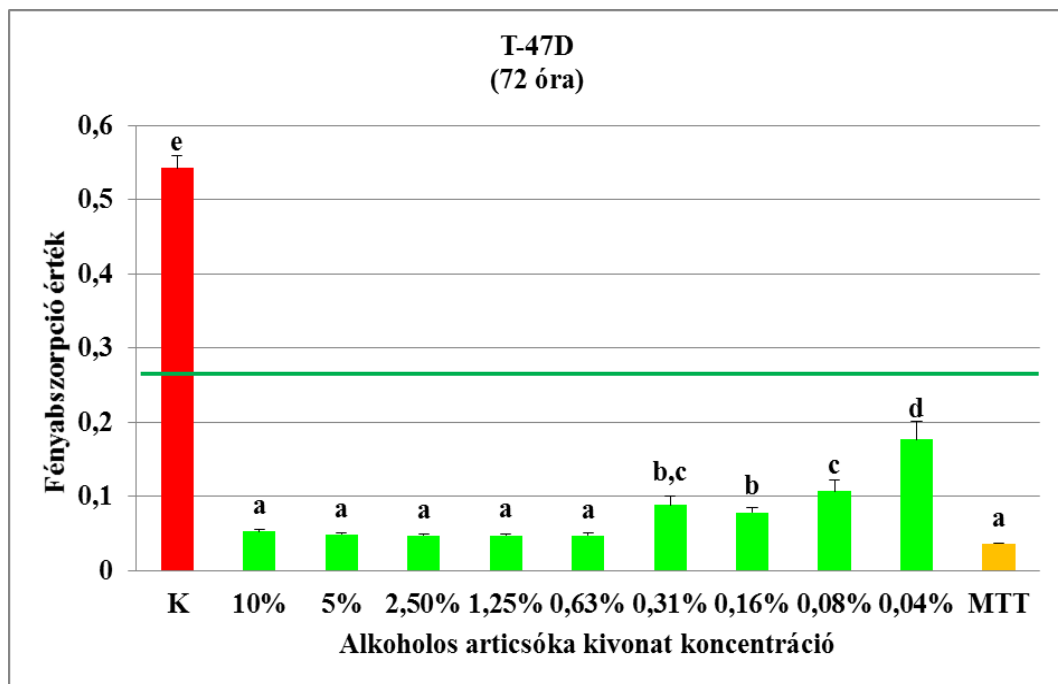
A T-47D humán emlőkarcinoma sejteket kezeltem 48 és 72 órán át különböző koncentrációjú alkoholos articsóka extraktummal, majd a kezelést követően elvégzett MTT teszt során mért fényabszorpció érték alapján következtettem a kezelést túlélő sejtek számára. A T-47D sejtvonalon és a különféle koncentrációjú szerves articsóka extraktummal elvégzett kísérletek eredményei a következő 21. és 22. ábrákon láthatók.



21. ábra: Az alkoholos articsóka kivonat hatása a T-47D emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 48 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

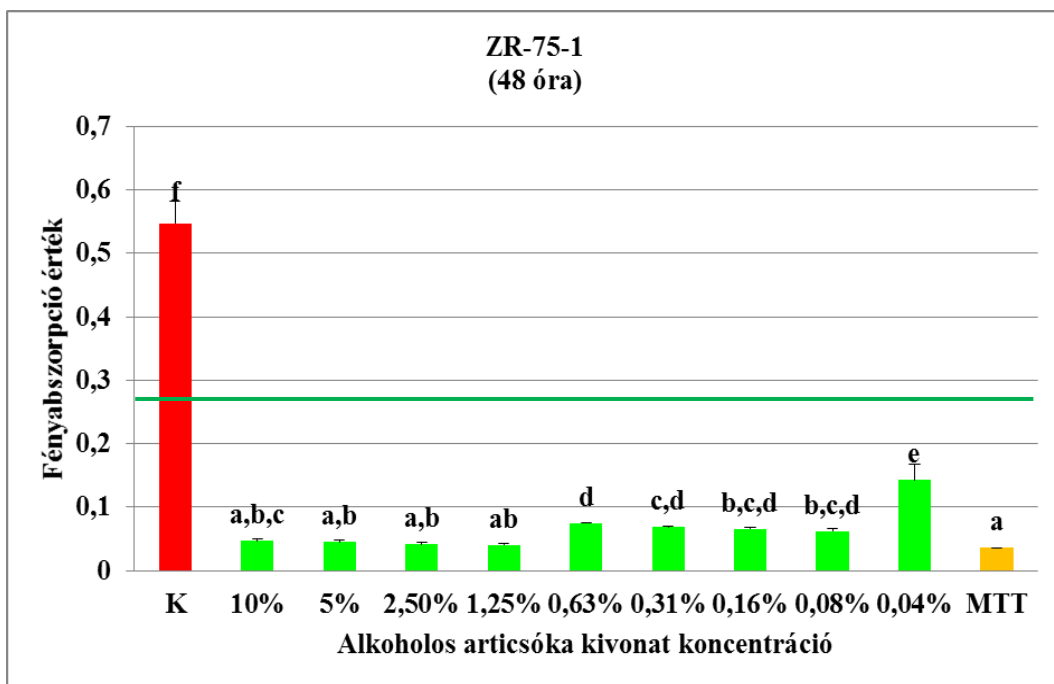
A 48 órás kezelés során kitűnik, hogy a 10-1,25%-os koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása jelentősen lecsökkent (21. ábra). A 0,63-0,08%-os koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása relatív magasabb az előbbi koncentráció tartományhoz viszonyítva, de a kontrollhoz képest továbbra is alacsony. Enyhe viabilitás növekedést csak a 0,04%-os extraktum esetében lehet megfigyelni, de még így sem érik el a kontroll sejtek viabilitásának felét. Így tehát kijelenthető, hogy a szerves articsóka esetében erőteljes citotoxikus hatás figyelhető meg.

A T-47D sejtvonalon az alkoholos articsóka kivonat különböző koncentrációjú és 72 órás alkalmazása során, a korábbi 48 órás kezelés során leírt erőteljes citotoxicitást figyeltem meg (22. ábra). A 48 és 72 órás időtartamú kezelések között nincs lényegi különbség, ugyanaz a citotoxicitás figyelhető meg.

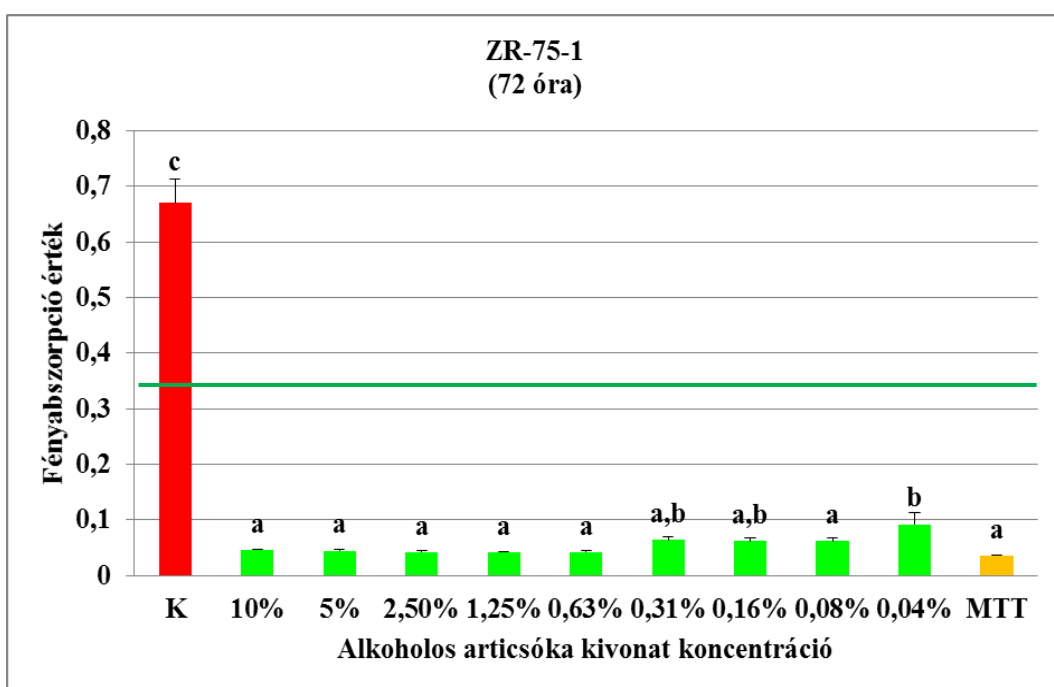


22. ábra: Az alkoholos articsóka kivonat hatása a T-47D emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 72 órás kezelést követően. K a kezetlen pozitív kontrol csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontrol csoport.

A T-47D sejtvonalat követően a ZR-75-1 humán emlőkarcinóma sejteket is kezeltem 48 és 72 órán át a különböző koncentrációjú alkoholos articsóka extraktummal, majd a kezelést követően elvégzett MTT teszt során mért fényabszorpció értékek alapján következtettem a kezelést túlélő sejtek számára. A ZR-75-1 sejtvonalon és különböző koncentrációjú alkoholos articsóka extraktummal végzett kísérletek eredményei a következő 23. és 24. ábrákon láthatók.



23. ábra: Az alkoholos articsóka kivonat hatása a ZR-75-1 emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 48 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.



24. ábra: Az alkoholos articsóka kivonat hatása a ZR-75-1 emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 72 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

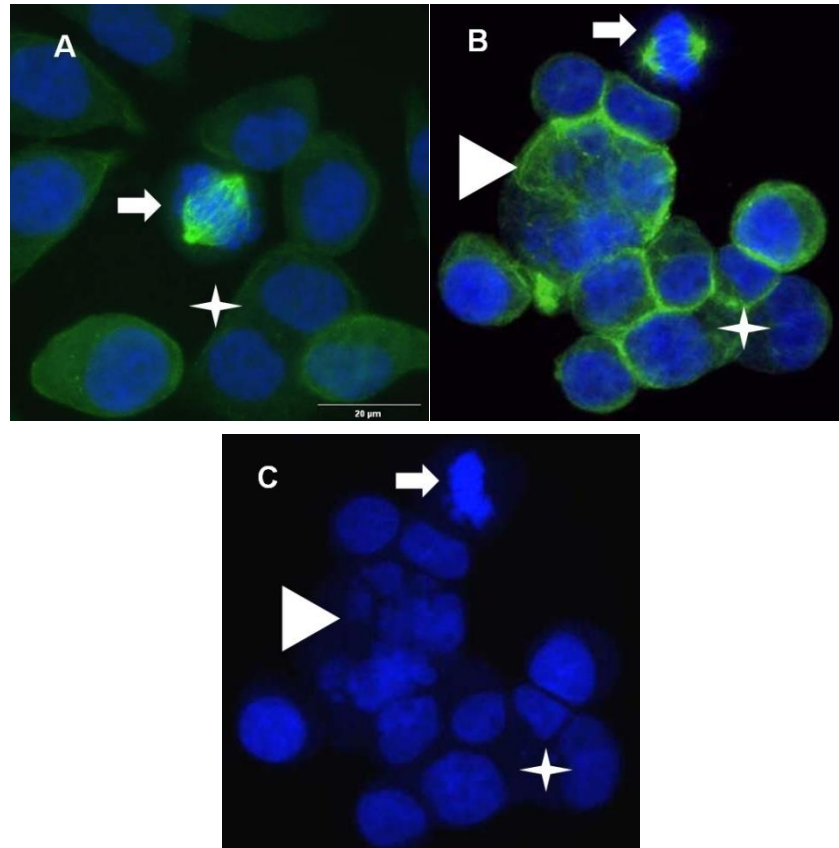
A ZR-75-1 sejtvonalon az alkoholos articsóka kivonat különböző koncentrációjú 48 órás alkalmazása során kitűnik, hogy a 10-1,25%-os koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása alacsony (23. ábra). Azonban a 0,63-0,04%-os koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása növekedik, de a kontrollhoz képest továbbra is alacsony marad, amint azt a T-47D sejtvonala esetében már tapasztaltam.

A ZR-75-1 sejtvonalon az alkoholos articsóka kivonat különböző koncentrációjú és 72 órás alkalmazása során a korábbi 48 órás kezelés során leírt erőteljes citotoxicitást figyeltem meg (24. ábra).

Annak érdekében, hogy további információkat szerezzek az alkoholos articsóka extraktumok indukálta citotoxikus hatásról, immunnhisztokémiai festésekkel tanulmányoztam a kezelt daganatos sejtek fenotípusát, beleértve azok kromoszóma struktúráját. Vizsgálataim során sikeresen detektáltam néhány interfázisban lévő-, mitotikus sejtet, poliploid sejtet, binukleáris sejtet, osztódási orsókat és multipoláris orsókat (25. ábra).

A poliploid sejtek leggyakrabban túlkondenzált és/vagy fragmentált kromoszómákkal mutatkoztak, ami a sejtöregedésnek és/vagy az apoptotikus sejtek jellegzetessége.

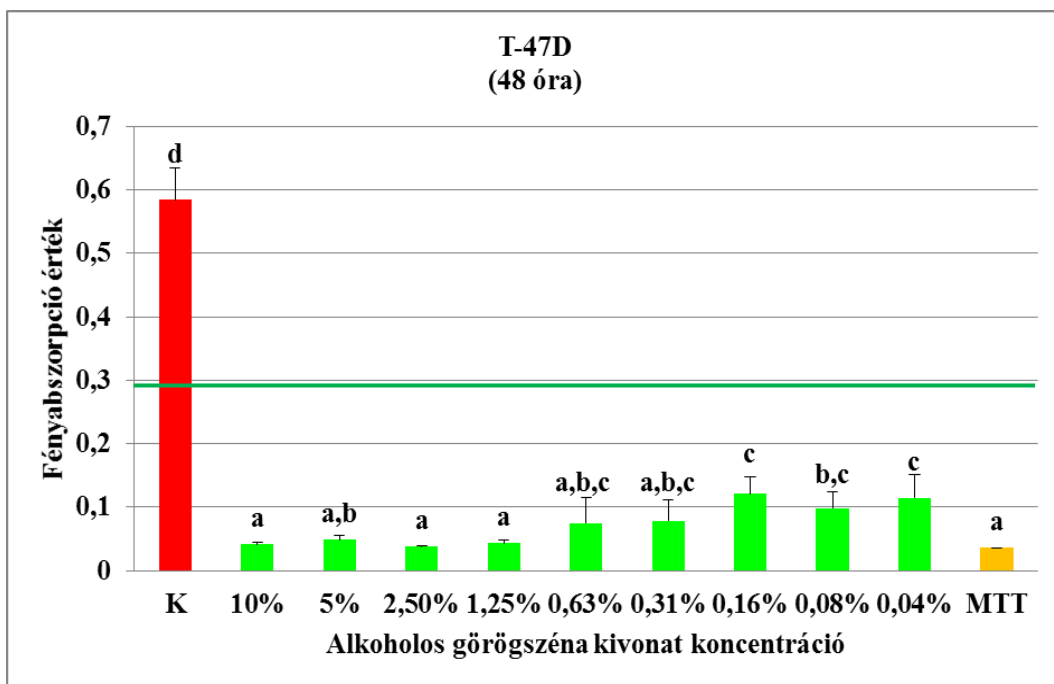
Az immunfestés alapú megfigyeléseim nem elegendők ahhoz, hogy kvantifikálni lehessen az egyes fenotípusokat, viszont további vizsgálatok elvégzésének jogosultságát támasztja alá, mint például egy áramlási citométerrel (FACS; Fluoreszcencia Aktivált Sejtválogatás és Analízis) történő analízist. A FACS lehetővé teszi azt, hogy adott időpontokban lehessen kiértékelni a kezelt sejtek fenotípusának koncentráció-függő változását egy kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva. Ebben az esetben a későbbi kutatásaim során az alkoholos articsóka- és görögszéna extraktumok daganatos sejtekre gyakorolt citotoxikus hatásáról, illetve a celluláris aspektusokról sokkal precízebb képet kaphatnék.



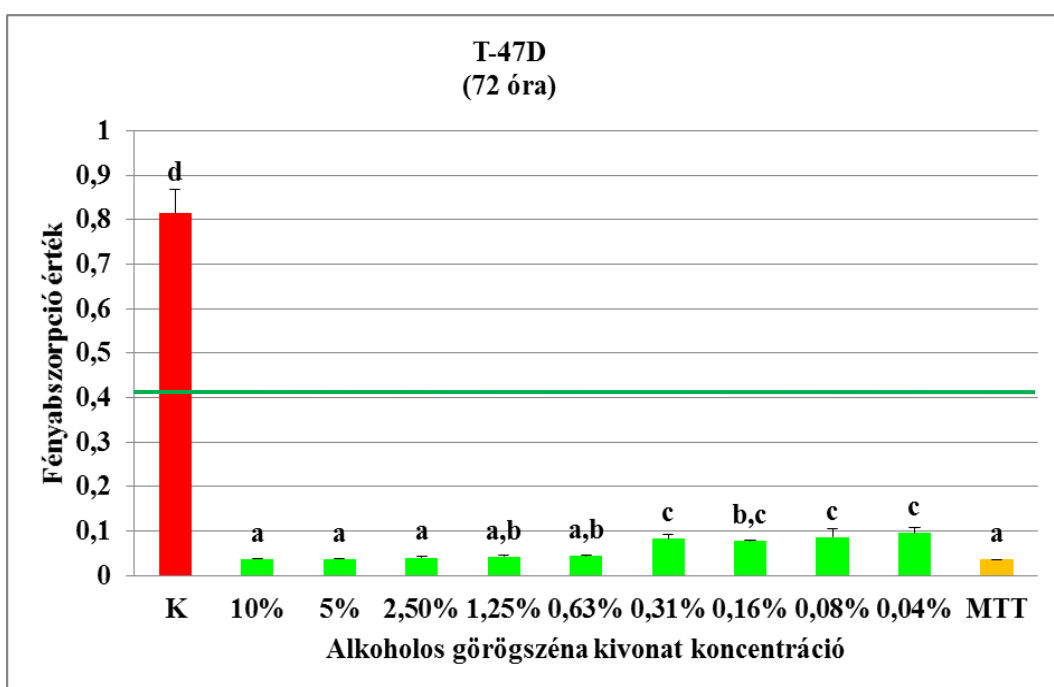
25. ábra: Alkoholos articsóka kivonattal kezelt emlőtumoros sejtek immunfestés során. Ahol: A: Kezeletlen kontroll sejtek. Normál kinézetű sejtek interfázisban, mitotikus metafázisban (nyíl) és binukleáris sejtek (csillag); a zöld rész a mikrotubulusokat mutatja, míg a kék szín a DNS-t. B-C: Kezelt sejtek. Poliploid sejtek kromoszóma fragmentációval és/vagy mikronukleusz (háromszög). Osztódási orsó túlkondenzált kromoszómával (nyíl). Binukleáris sejt (csillag). A zöld rész a mikrotubulusokat, míg a kék szín a DNS-t jelöli.

5.5.4. Az alkoholos görögszéna extraktum sejtvonalak életképességére gyakorolt hatása

A T-47D humán emlőkarcinoma sejteket kezeltem 48 és 72 órán át a különböző koncentrációjú alkoholos görögszéna extraktummal, majd a kezelést követően elvégzett MTT teszt során mért abszorbancia érték alapján következtettem a kezelést túlélő sejtek számára. A T-47D sejtvonalon a különböző koncentrációjú szerves görögszéna extraktummal végzett kísérletek eredményei a 26. és 27. ábrákon láthatók.



26. ábra: Az alkoholos görögszéna kivonat hatása a T-47D emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 48 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.



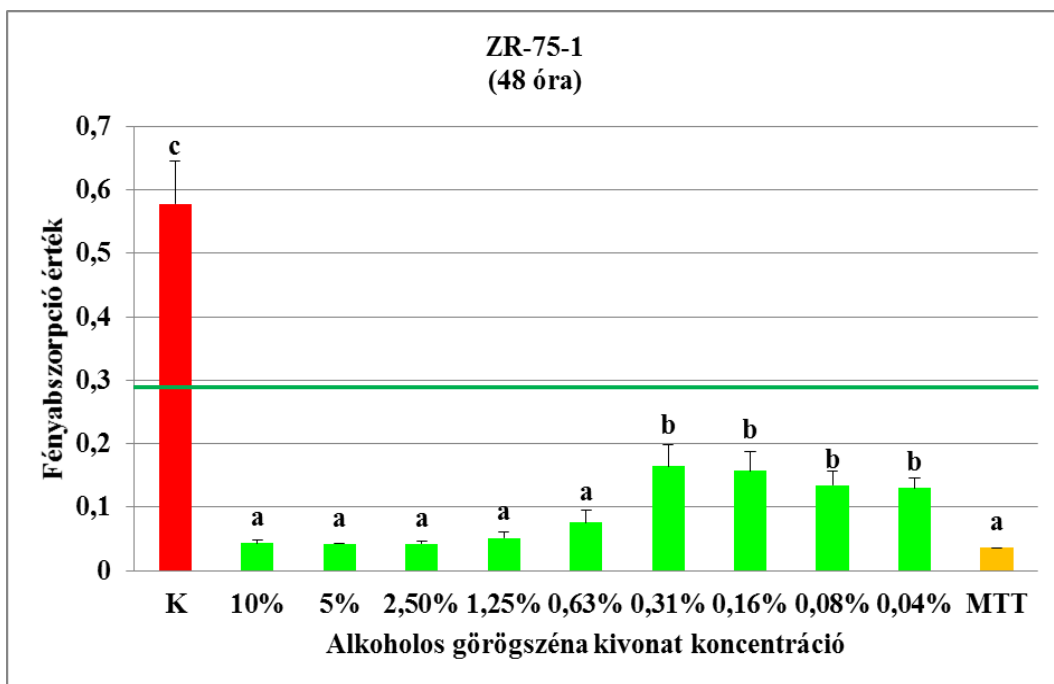
27. ábra: Az alkoholos görögszéna kivonat hatása a T-47D emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 72 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

A 48 órás kezelés során megfigyelhető, hogy a 10-0,04%-os koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása jelentősen alacsony (26. ábra). Így kijelenthető, hogy a szerves görögszéna kezelések esetében erőteljes citotoxikus hatás figyelhető meg.

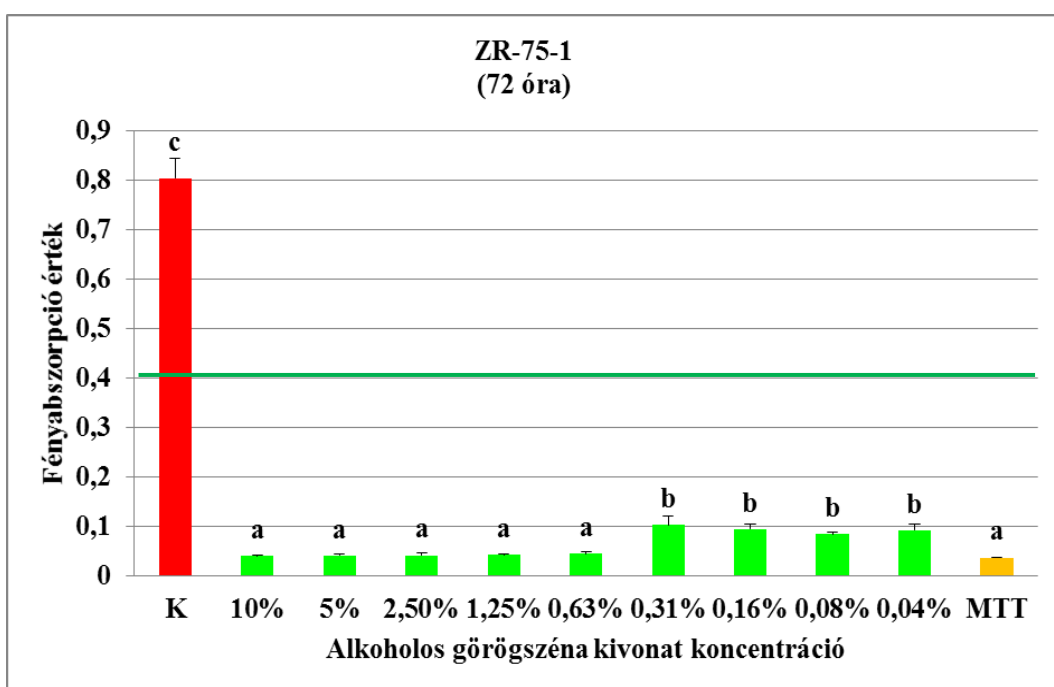
A T-47D sejtvonalon az alkoholos görögszéna kivonat különböző koncentrációjú 72 órás alkalmazása során, a korábbi 48 órás kezelés során leírt erőteljes citotoxicitást figyeltem meg (27. ábra). A 48 és 72 órás időtartamú kezelések között nincs lényegi különbség a T-47D sejtek esetében, hiszen közel azonos citotoxicitás volt megfigyelhető.

A T-47D sejtvonalat követően a ZR-75-1 humán emlőkarcinoma sejteket is kezeltem 48 és 72 órán át különböző koncentrációjú alkoholos görögszéna extraktummal, majd a kezelést követően elvégzett MTT teszt során mért abszorbancia értékek alapján következtettem a kezelést túlélő sejtek számára. A ZR-75-1 sejtvonalon a különböző koncentrációjú alkoholos görögszéna extraktummal végzett kísérletek eredményei a következő 28. és 29. ábrákon láthatók.

A ZR-75-1 sejtvonalon az alkoholos görögszéna kivonat különböző koncentrációjú 48 órás alkalmazása során kitűnik, hogy a 10-0,63%-os koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása alacsony (28. ábra). Azonban a 0,31-0,04%-os koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása elkezd növekedni, de a kontrollhoz képest továbbra is alacsony marad, mint azt a T47D sejtvonal esetében már tapasztaltam.



28. ábra: Az alkoholos görögszéna kivonat hatása a ZR-75-1 emlőkarinóma sejtek proliferációjára 48 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

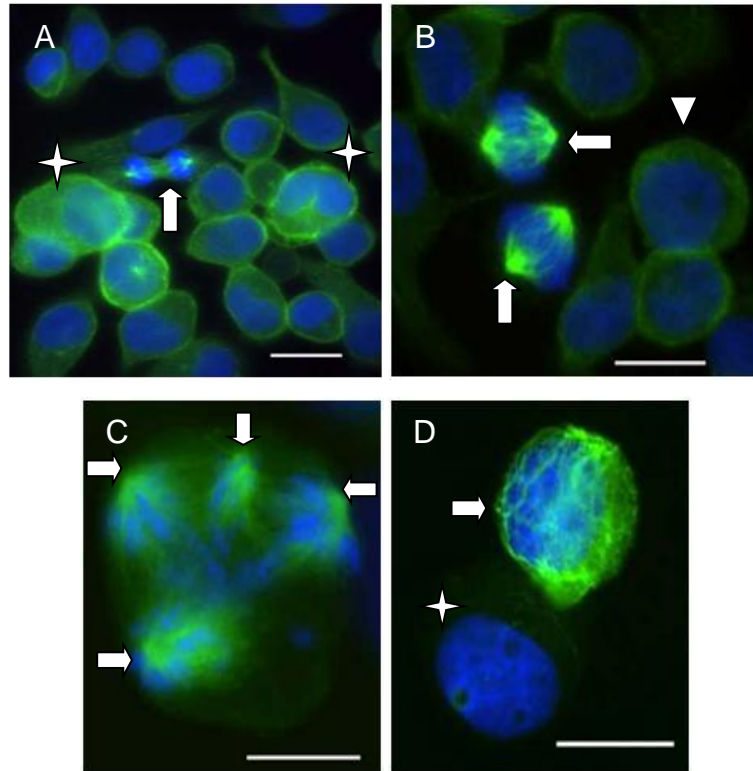


29. ábra: Az alkoholos görögszéna kivonat hatása a ZR-75-1 emlőkarinóma sejtek proliferációjára 72 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

A ZR-75-1 sejtvonalon az alkoholos görögszéna kivonat különböző koncentrációjú 72 órás alkalmazása során a korábbi 48 órás kezelés során leírt erőteljes citotoxicitást figyeltem meg (29. ábra).

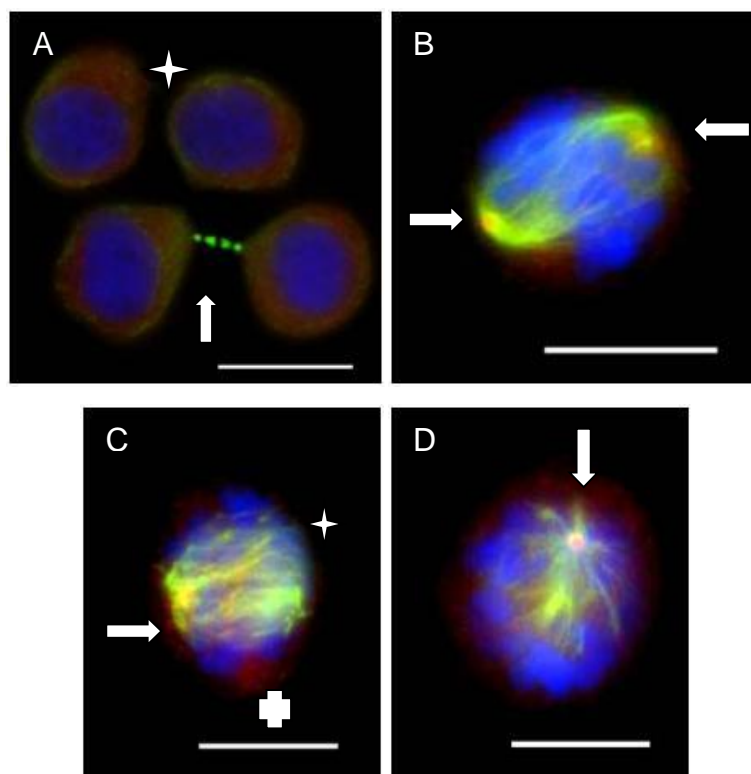
A fentiekben tapasztalt citotoxicitás további jellemzése érdekében immunocitokémiai festéseket végeztem a kezelt sejteken. Egy ilyen megközelítés megfelelhet egy fenotípusos tanulmánynak, eltérően egy olyan klasszikus genetikai analízistől, ahol mutáns allélok idéznek elő fenotípusokat, hiszen jelen esetben az extraktum a felelős a citotoxicitás előidézéséért. A kezelt rákos sejtek kapcsán immunfestéssel többszörös celluláris defektust voltam képes detektálni. Sejtosztódási defektusokat és karakterisztikus apoptotikus jellemvonásokat tudtam identifikálni. Továbbá azonosítottam normál interfázisban lévő sejteket és osztódó sejteket, beleértve a több sejtmaggal rendelkező, feltehetően aneuploid sejteket, kis- vagy többpólusú orsóval rendelkező sejteket, valamint olyan sejteket is, amelyekben a sejtmag „blubbing” jelensége vagy a kromoszóma fragmentálódása volt látható, mely utóbbi az apoptózisra specifikus (30. és 31. ábra).

Továbbá a mitotikus osztódási orsók szerkezetét is megvizsgáltam, így a Polo-kináz1 (Plk1) szubcelluláris lokalizáció monitorizálása során több információt nyertem a mitózisba való belépésről, a mitotikus orsó kialakulásáról, a kromoszóma elrendeződéséről, a testvérkromatid szegregációról (szétválás), a metafázis-anafázis átmenetről és a citokinézisről. Kimutatták, hogy a Plk1 majdnem minden mitotikus eset megjelenését szabályozza, valamint az „over-expressziója” számos ráknak kis prognózisú markere (Weng *et al.*, 2016). A görögszénamag extraktumokkal kezelt sejtek esetében azt találtam, hogy a Plk1 néhány esetben kapcsolatban állt a centroszómákkal, míg más esetben a mitotikus apparátusok (orsó apparátusok) felhalmozódása látszódtott a központi orsó mikrotubulusok mentén (31. ábra).



30. ábra: Alkoholos görögszénamag kivonattal kezelt emlőtumoros sejtek immunfestés során. Ahol: A: Kezeletlen kontroll sejtek interfázisban óriási sejtmaggal (csillag) és normál anafázis. B: Kezeletlen kontroll sejtek interfázisban (háromszög) és mitotikus metafázis (nyíl). C: Kivonattal kezelt sejt abnormális multipoláris orsóval, kromoszóma-felhalmozódás az orsócsúcsokban (nyíl) D: Kivonattal kezelt sejt szétesőben lévő sejtmaggal („blubbing jelenség”) és abnormális mikrotubulus hálózattal (nyíl), közvetlenül összehasonlítva egy normál interfázisban lévő sejtrel (csillag). A zöld rész a mikrotubulusokat mutatja, míg a kék szín a kromoszóma specifikus DNS-t. A vonalzó 20 μm hosszúságot jelöl.

Annak ellenére, hogy a kivitelezett immunfestések révén sikerült bizonyos sejt defektusokat feltárni, kvantitatív analízist nem végeztem el, mivel a 48 órás és a 72 órás kezelések után általában a sejtszám jelentősen lecsökkent.



31. ábra: Alkoholos görögszénamag kivonattal kezelt emlőtumoros sejtek immunfestés során. Ahol: A: Kezeletlen kontroll normál sejtek interfázisban (csillag) és citokinezis (nyíl). B: Kezeletlen kontroll sejt. Mitotikus metafázis-anafázis átalakuló sejt centroszómával az orsócsúcsban és PLK centroszómákkal, de nem kinetokór (nyíl). C: Kivonattal kezelt sejt rendellenes bipoláris orsóval, az egyik csúcsban normál centroszómák PLK akkumulációval (nyíl), míg a szemközti csúcs centroszómák nélkül sokkal világosabb (csillag), valamint az orsó mikrotubulusok mellett PLK felhalmozódás (plusz) D: Kivonattal kezelt sejt rendellenes monopoláris orsóval, mely a centroszómával együtt PLK akkumulációt mutat az orsócsúcsban (nyíl). A zöld rész a mikrotubulusokat jelöli, a piros a PLK-t, míg a kék szín a kromoszóma specifikus DNS-t. A vonalzó 20 μm hosszúságot jelöl.

6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A disszertációmban azokról a kutatásokról számolok be, amelyek az articsóka és a görögszéna beltartalmi értékei, illetve humán élettani hatásai közötti összefüggésekre irányulnak.

A vizes és az alkoholos articsóka extraktumok eltérő bioaktív összetevővel és emlőkarcinóma ellenes hatással rendelkeznek

A vizes articsóka extraktum bifázisos élettani, míg az alkoholos extraktum erőteljes citotoxikus hatást mutatott a T-47D és a ZR-75-1 humán emlőkarcinoma sejtvonalakon. A kezelt sejtek immunfestésére alapozott közvetett kísérleti bizonyítékok azt sugallják, hogy az alkoholos articsóka kivonat apoptózist indukál még a nagyon alacsony koncentrációk esetében is. Az alkoholos- és vizes articsóka kivonatok kémiai összetételére irányuló analitikai vizsgálat során néhány bioaktív összetevőt csak az alkoholos vagy csak a vizes kivonatokban sikerült kimutatni. Az alkoholos articsókalevél kivonatban olyan specifikus összetevőket azonosítottam, mint a szkopoletin, apigenin, diosmetin, isorhoifolin, salvigenin, naringin-dihidro-kalkon, urzolsav, sztearidonsav metilészter és sztearidonsav etilészter, mely vegyületek egyedi tumorelles tulajdonságait már korábban igazolták. Valószínűsíthető, hogy ezek a bioaktív összetevők azáltal, hogy különböző celluláris mechanizmusokon keresztül hatnak, erős együttes viabilitást gátló hatást fejtenek ki. Érdekes módon, amikor a vizes articsókalevél kivonatok élettani hatását tanulmányoztam a T-47D és a ZR-75-1 emlőkarcinoma sejtvonalakon, akkor a sejtek viabilitása koncentráció- és időfüggő módon is változott. Összetételét tekintve, a vizes articsóka extraktumban kizárólagos előfordulást mutatott a sztahidrin, a polifenolok, az AMP, a GMP, az uridin és a piridoxál. Az élettani hatást tekintve általánosan elmondható, hogy magasabb koncentrációkban a vizes articsókalevél kivonat erőteljesen csökkentette az emlőkarcinoma sejtek viabilitását, míg alacsonyabb koncentrációkban a gátló hatása eltűnt, és növekvő viabilitás, vagyis feltehetőleg proliferációt stimuláló hatás volt megfigyelhető.

A vizes articsóka kivonat által indukált koncentrációfüggő válasz egy bifázisos hatás volt (13.-16. ábra). Az ilyen típusú adatok hormézisre, azaz olyan dóziszfüggő hatásra utalnak, amely egy alacsony koncentrációjú stimuláció és egy magas koncentrációjú gátló hatásként mutatkozott. Hasonló hormetikus dóziszfüggő választ figyeltek már meg kemikáliák és sugárzás esetén is, és javasolták, hogy a biológiai

stresszválaszokat hormetikus kontextusban kellene értelmezni (Mitchell, 2007; Calabrese és Baldwin, 1999; Calabrese, 1999; Calabrese és Baldwin, 2000; Calabrese *et al.*, 2012).

Az eredményeim a hormézis kontextusába helyezve azt mutatják, hogy a vizes és az alkoholos articsókalevél kivonatok esetén látott emelkedett szintű toxicitás feltételezhetően az apoptózisnak köszönhető, míg az alacsony vizes articsóka koncentrációknál a megnövekedett viabilitás valószínűleg kapcsolatban áll az adaptív stresszválaszokkal, amelyek facilitálhatják a vizsgált rákos sejtvonalak osztódását. Ebből a szempontból további tanulmányok szükségesek azon megállapításhoz, hogy milyen molekuláris sejtmechanizmusok járulnak hozzá ehhez az adaptív stresszválaszhoz, illetve ugyanannyira fontos lenne fényt deríteni az articsókalevél kivonataim nagy koncentrációjú toxicitása mögött álló celluláris mechanizmusokra is.

Számos tényezőt kell számításba venni a jövőbeni tanulmányok szempontjából, mivel a T-47D és a ZR-75-1 mellrák sejtvonalakat kiterjedten alkalmazzák a biomedikális kutatásban, melyeket korábban ösztrogén receptor pozitív daganatként klasszifikálták (Ford *et al.*, 2011). Az ösztrogén receptorokról kimutatták, hogy kritikus szerepet játszanak a mellráksejtek növekedésének fokozásában/elősegítésében. A jövőben nagy jelentőségű lenne megállapítani az articsóka kivonataim ösztrogén receptor modulátor hatását, mivel más növényi kivonat (Huaier kivonat) szignifikánsan csökkentette az ösztrogén receptor α (ER α) mRNS és protein szintjeit a T-47D és a ZR-75-1 ER α pozitív sejtvonalakban. Az ER α protein szintjének downregulációja összefüggésben volt a proteaszómák aktivációjával és az ösztrogén stimulált proliferáció gátlásával, valamint visszafordította a nukleáris faktor κ B (NF κ B) útvonal ösztrogén indukálta aktiválódását (Wang *et al.*, 2013). Újabb kutatások igazolták, hogy a malignus pleurális mezotelioma sejtvonalak fokozott citotoxicitást mutattak, amikor articsókalevél kivonattal kezelték őket. Megállapították, hogy az azonosított hibásan regulált jelátviteli útvonalak kapcsolatban voltak a daganat kialakulásával és progressziójával (Sharma *et al.*, 2016). Az articsóka kivonatok alkalmazott koncentrációi mellett figyelni kell az egyes kezelések időtartamára is, mivel alacsonyabb koncentrációjú kezelés során kimutatták, hogy hosszabb inkubáció mellett a rákos sejtvonalak növekedése gátlódott egy apoptózistól független mechanizmus révén. Kísérleti adatok szerint, amikor articsóka friss terméséből készített, magas polifenol-tartalmú kivonatokkal kezelték hosszú időtartamig MDA-MB231 humán mellráksejteket, akkor a kezelés a sejtöregedés okozta növekedés-gátlást indukált epigenetikus és ROS mediált mechanizmusok által (Mileo *et al.*, 2015).

Mindent egybevéve a kísérleti adataim azt mutatják, hogy a vizes és az alkoholos articsóka kivonatok alkalmazhatók lehetnek bizonyos tumorellenes terápiák kiegészítésére, azonban további vizsgálatok szükségesek, mielőtt bármilyen lépés is történne a komplementer kezelésként történő használatuk terén. Ebből a szempontból fontos lenne számításba venni és tanulmányozni az articsóka kivonataim lehetséges májvédő hatását több krónikus betegség kapcsán is, mivel számos májvédő bioaktív összetevőt sikerült azonosítani bennük. Ismeretes, hogy a kemoterápiához kapcsolódó májkárosodás késlelteti a rákbetegek kezelését és gyakran javasolt a tumorellenes terápia májvédő szerekkel történő kiegészítése (Angelini *et al.*, 2012). A potenciális tumorellenes hatás mellett az a tény, hogy a vizes és az alkoholos articsóka kivonataim nem bizonyultak sem citotoxikusnak sem genotoxikusnak a *Drosophila melanogaster* alapú vizsgálataim során, reménnyel tölt el a humán nem tumoros sejtekre vonatkozóan is. Egészséges humán vonatkozásban eddig nem írtak le cito- és/vagy genotoxikus hatásokat az articsóka kapcsán. Ez a metodikai megközelítés az élelmiszer-biztonsági vizsgálatokban új perspektívát nyithat.

A vizes és az alkoholos görögszéna extraktumok eltérő bioaktív összetevővel és emlőkarcinoma ellenes hatással rendelkeznek

Vizsgálataim során a vizes és az alkoholos görögszénamag kivonatok specifikus sejt viabilitási hatásokat mutattak a kísérletbe vont humán emlőkarcinoma sejtek esetében. A vizes görögszénamag kivonat esetében, hasonlóan a vizes articsóka kivonathoz, koncentráció-függő hormetikus hatást tapasztaltunk. A kezelt T-47D és ZR-75-1 sejtek jellemzően megközelítőleg ugyanolyan koncentráció- és időtartam függő viabilitási profillal rendelkeztek. Kizárólag néhány, de szignifikáns különbséget fedeztem fel a 48 órás kezelése során, mely alapján megállapítottam, hogy a vizes görögszénamag kivonattal történő kezelésekre a T-47D sejtvonal sokkal érzékenyebben reagál, mint a ZR-75-1 sejtvonal.

Az egyelőre nyitott kérdés maradt, hogy hogyan magyarázható a hormézis specifikus kis dózisu stimuláció és a nagy dózisu gátlás a vizes görögszénamag kivonat esetén. A hormézisről általánosságban elmondható, hogy a nagy koncentrációjú kezeléseknél a toxikológiai tartományban sejtkárosodás következik be, míg az alacsony koncentrációjú specifikus stimuláció hatására a vitagének által facilitált adaptív stresszválasz jelenik meg. A hőszokkfehérjéket kódoló génekről – (hemoxygenáz, tioredoxin és a glutation rendszer) – és a sirtuin proteinekről azt feltételezik hogy

vitagénként működnek (Calabrese *et al.*, 2012). A vitagének antioxidáns enzimeket, chaperonokat (dajkafehérje), fázis II enzimeket, citoprotektív proteineket és a KEap1/Nrf2/ARE intracelluláris jelátviteli útvonalat aktiválják. A tanulmányozandó élettani hatás bonyolultságára utal az a tény is, mely szerint a biológiai válaszok hatásai determinisztikus és sztohasztikus természetűek is lehetnek. Korábban egy vizes görögszéna kivonatot már teszteltek, és szelektív citotoxicitást észleltek olyan rákos sejtvonalak kapcsán, mint a T-sejtes limfoma (TCP), a B-sejtes limfomák, a pajzsmirigy papilláris karcinóma (FRO) és a mellrák (MCF-7), míg a normális sejtekkel szemben nem volt citotoxikus hatás észlelhető (Alsemari *et al.*, 2014). Ilyen jellegű szelektivitásra utalnak a *Drosophila melanogaster*-en végzett kísérleteim is, mivel ezek normális sejtekre vonatkoznak, és sem a vizes sem pedig az alkoholos görögszéna kivonatnak nem voltak viabilitást csökkentő vagy citotoxikus-, illetve genotoxikus hatásai.

Különösen figyelemre méltó a vizes és az alkoholos görögszénamag kivonatok által indukált sokrétű biológiai hatás. Amikor a T-47D és a ZR-75-1 sejteket alkoholos görögszénamag kivonattal kezeltem, a teljes koncentráció tartományban kifejezetten csökkentett viabilitás volt tapasztalható, valamint a hormetikus válasz nem volt kimutatható. Úgy tűnik, hogy az alkoholos kivonat erőteljesebb citotoxicitást mutat, mint a vizes görögszénamag kivonat. Az indirekt immunfestésen alapuló kísérleti bizonyítékaim azt mutatják, hogy az alkoholos görögszénamag kivonat apoptózist indukálhat, mivel sok mitotikus orsó defektus volt megfigyelhető még az alacsony koncentrációjú kezeléseknél is (30-31. ábra). Amikor a vizes és az alkoholos görögszéna kivonatok bioaktív összetevőinek profilját összehasonlítottam, számos különbség volt megfigyelhető. Olyan bioaktív összetevők, mint a 4-HIL, az aszparagin, az adenin, az adenzin, az adenzin 3',5'-ciklikus-monofoszfát, a citidin és a guanin csak a vizes kivonatban voltak azonosíthatóak. Más összetevők, mint az aszpartámsav, a szkopoletin, a rezveratrol, a naringenin, a krizoeriol, a tricin, a luteolin-8-C-(2''-O-(E)-p-coumaroylglükózid), a tricin-7-O-glükózid, a genisztein, a vitexin, a medikarpin, a szkoparin, az 5'-S-Metil-5'-tioadenozin, a flavin mononukleotid (FMN), a xantin, a szójaszaponin I, a protoneogitogenin-S5, az urzolsav és a B3 vitamin csak az alkoholos kivonatban voltak megtalálhatóak. Az alkoholos kivonatban lévő specifikus naringenin, vitexin és izovitexin kapcsán kimutatták, hogy modulálja a SIRT6 *in vitro* H3K9 deacetilációs aktivitást (Singh *et al.*, 2014). A SIRT6 gén, a glükóz homeosztázis fő regulátora, többféle glikolitikus gén expresszióját szabályozza (Dominy *et al.*, 2012, Liu *et al.*, 2012). Még inkább érdekes volt az a megállapítás, hogy a diosgenin csak az

alkoholos görögszéna kivonatban van jelen nagyon alacsony mennyiségben, míg a protodioscin és a protodiosgenin mindkét kivonatból hiányzott. Ez azt jelenti, hogy sem a dioszenin sem a protodioscin és a protodioszenin sem felelős az általam készített görögszénamag kivonatok toxicitásáért, amint az várható lett volna az MCF-7 humán mellrák sejtvonal (Srinivasan *et al.*, 2009) és a HL-60 humán leukémia sejtvonal (Hibasami *et al.*, 2003) kísérleti eredményei alapján.

A görögszénamag kivonataim között további különbségnek számít a 4-HIL kizárólagos jelenléte a vizes extraktumban. Kimutatták, hogy a 4-HIL gátolhatja a TNF α szekrécióját a 3T3-L1 adipocitákban (Yu *et al.*, 2013), továbbá azt is, hogy a TNF α csökkenése hozzájárulhat néhány rákos sejt túléléséhez (Aggarwal *et al.*, 2012).

A vizes és az alkoholos görögszéna kivonataimmal történő jövőbeli kutatásaim az ösztrogén receptor modulátor hatás vizsgálatára is fókuszálni fognak, figyelembe véve azt a tényt, hogy a görögszéna ösztrogén aktivitását már korábban kimutatták (Sreeja *et al.*, 2010). Amint azt már említettem a T-47D és a ZR-75-1 humán emlőkarcinoma sejtvonalakat ösztrogén receptor (ER) pozitívként határozták meg. Az ösztrogén receptorról kimutatták, hogy elősegíti a mellrák sejtek növekedését (Ford *et al.*, 2011). További növényi kivonatokon alapuló tanulmányokat végeztek a T-47D és a ZR-75-1 sejteken, amelyek eredményei szerint a görögszéna szignifikánsan csökkentette az ösztrogén receptor α mRNS és protein szintjeit, mely hatás összefüggésbe hozható a proteaszómák aktivációjával és az ösztrogén stimulált proliferáció gátlásával (Wang *et al.*, 2013).

Annak ellenére, hogy számos tanulmány utal a görögszénamag rákellenes tulajdonságaira (Goyal *et al.*, 2016; Chatterjee *et al.*, 2012; Shabbeer *et al.*, 2009; Sebastian és Thampan, 2007; Amin *et al.*, 2005), a jótékony hatásai továbbra is ellentmondásosak, mivel csak nagyon kevés klinikai kutatást végeztek görögszénával kombinált rákterápia kapcsán (Swaroop *et al.*, 2015; Alsemari *et al.*, 2014), valamint némi genotoxikus hatást is kimutattak (Ouzir *et al.*, 2016; Flammang *et al.*, 2004). Alsemari és munkatársai (2014) egy esettanulmány keretében először mutatták be a klinikai profilját egy olyan elsődleges központi idegrendszeri (CNS) T sejt limfómás betegnek, aki reagált egy olyan görögszéna kezelésre, ami tumor regressziót eredményezett. Swaroop és munkatársai (2015) is leírták a görögszénamag kivonat alapú kezelés jótékony hatásait egy policisztikus ovárium szindróma kapcsán. Más klinikai tanulmányok a kettős típusú diabéteszes betegek görögszéna alapú kezelésének jótékony hatásait mutatták ki (Verma *et al.*, 2016), és igazolták továbbá, hogy egy görögszéna alapú étrendkiegészítő javíthatja a tesztoszteron szintet, az egészséges sperma profilt, a

mentális éberséget, a kardiovaszkuláris egészséget és az általános teljesítőképességet férfiakban (Mahesvari *et al.*, 2017). Ugyancsak érdekes, mely szerint Assad és Khan (2016) vizsgálataik során kimutatták, hogy a görögszénamagok nem fejtenek ki szedatív (álmosító) hatást, ellenben a szignifikáns nyugtató hatását igazolni tudták. Bár a görögszéna fogyasztása emberekben, rágcsálókban, nyulakban és csirkékben is teratogén hatásokat indukált a kongenitális malformációtól az abortuszig, míg patkányokban, egerekben és nyulakban a hím egyedek esetében heretoxicitást, terméketlenséghez asszociált oxidatív stresszt és DNS károsodást találtak (Ouzir *et al.*, 2016).

Mindent egybevetve az adataim azt mutatják, hogy a vizes és az alkoholos görögszénamag kivonataim megfontolásra érdemesek lehetnek a mellrákos betegek kiegészítő terápiájának tekintetében, bár további tanulmányok szükségesek ahhoz, hogy biztonsággal megállapítsam a potenciális hatásait, mielőtt bármilyen lépést is tennék a kiegészítő terápiás használatuk tekintetében. Ebből a szempontból fontos lenne alaposan kiértékelni minden lehetséges rákellenes, diabétesz ellenes, koleszterinszint csökkentő és gyulladáscsökkentő hatását a hazai eredetű görögszénamag alapú kivonataimnak.

Az articsóka és a görögszéna kivonatok összpolidifenol-, összflavonoid-tartalma, valamint az *in vitro* antioxidáns kapacitás értékei és az élettani hatásaik között nincs egyértelmű összefüggés

Kutatásaim során azt tapasztaltam, hogy az összpolidifenol és összflavonoid tartalom alacsonyabb ugyan a vizes articsóka és görögszéna kivonatokban, mégis az *in vitro* antioxidáns kapacitás magasabb értékeket mutat ezekben a kivonatokban.

Amennyiben az UHPLC-ESI-MS rendszer által beazonosított polifenol és flavonoid típusú bioaktív hatóanyagok számának az *in vitro* antioxidáns kapacitáshoz való arányát extraktumonként vizsgálom, akkor azt tapasztalom, hogy a kevesebb számú kérdéses bioaktív hatóanyagot tartalmazó vizes extraktumok esetében az *in vitro* antioxidáns kapacitás magasabb értékeket mutat (25. táblázat). Tehát a kisebb koncentrációjú és kevesebb komponensű polifenol- és flavonoid-tartalmú vizes articsóka, illetve görögszéna kivonatoknak van magasabb *in vitro* antioxidáns aktivitása.

Ezt az ellentmondásos ténytet megmagyarázva, arra gondolok, hogy az articsóka és görögszéna vizes extraktumokban, a polifenol- és flavonoid-tartalom túl, még lennie kell olyan bioaktív hatóanyag(ok)nak, amely(ek)et az UHPLC-ESI-MS rendszerrel nem sikerült nagy pontossággal azonosítani, ám aktivitásuk jelentős mértékben hozzájárulhat az *in vitro* körülmények között mért antioxidáns kapacitáshoz. Ezt a feltevést

leellenőrizve újból áttekintettem az UHPLC-ESI-MS mérés során kapott eredményeket és azt találtam, hogy olyan természetes antioxidáns, mint a C-vitamin, minden általam vizsgált extraktumban előfordul, amint azt a molekulatömege sugallja, viszont a fragmentációja nem ismert, így nem tüntettem fel a korábbiakban azonosított bioaktív hatóanyagok között. A glutation egy másik igen fontos természetes antioxidáns, amely redukált formában előfordul a vizes és szerves articsóka, valamint a görögszéna vizes extraktumban, azonban a glutation fragmentációja sem ismert, így az az UHPLC-ESI-MS rendszerrel történő mérések során sem beazonosítható.

Természetesen az is feltételezhető, hogy a vizes articsóka és görögszéna kivonatokra jellemző magasabb *in vitro* antioxidáns kapacitás abból is eredhet, hogy az alkalmazott kísérleti módszer nem volt alkalmas az alkoholos articsóka és görögszéna kivonatok *in vitro* antioxidáns kapacitásának pontos mérésére. E módszer inadekváltsága abból is fakadhat, hogy az általam készített alkoholos kivonatokban olyan makromolekuláris komplexek képződnek, amelyek nem lesznek képesek a DPPH-gyököt megkötni (Remenyik J. nem-publikált eredmények). Bizonyított tény, hogy a DPPH-mérésen alapuló *in vitro* antioxidáns kapacitás meghatározás pH-, oldószer-, fény- és oxigénfüggő, valamint a DPPH gyököt relatíve rossz hozzáférhetőség jellemzi (Frankel-Meyer, 2000; Huang *et al.*, 2005). Így elképzelhető, hogy az alkoholos articsóka és görögszéna kivonataim magasabb összpolicifenol- és összflavonoid-tartalma ellenére alacsonyabb DPPH gyökbefogó aktivitással rendelkeznek.

Tehát a kísérleteim alapján megállapítható, hogy a növényi extraktumok *in vitro* körülmények között mért antioxidáns kapacitását nagy körültekintéssel kell értelmezni az *in vivo* hatásmechanizmusuk tanulmányozásakor.

Az *in vivo* tesztrendszerek alkalmazásának szükségessége az articsóka és a görögszéna kivonatok hatásainak tanulmányozása során

Kísérleti eredményeim alapján igazolást nyert, hogy az articsóka és görögszéna kivonatok eltérő bioaktív hatóanyag összetétellel rendelkeznek, mely alapján prediktálni lehet azok rákellenes hatását. Ezt az *in vitro* emlőkarcinoma sejttenyészeteken végzett kutatásaim során tudtam igazolni. A sejttenyészeteket azért tekintjük *in vitro* tesztrendszereknek, mert a vizsgált sejteket mintegy kivesszük a soksejtes eukarióta egyed neurohumorális szabályozása alól, így csak a transzformálódott sejtekre jellemző genomi, sejtciklusi és sejtmétabolizmusi integratív mechanizmusok érvényesülnek. Így

az *in vitro* sejttenyésztés során kapott eredményeket nem lehet általános érvényűnek tekinteni, sőt mi több, azok csak irányadóak lehetnek a normális sejtek esetében.

Az a tény, hogy a vizes articsóka és görögszéna extraktumok hormézisre, míg az alkoholos articsóka és görögszéna extraktumok erős citotoxicitásra utaló eredményeket mutatnak, arra enged következtetni, hogy a vizes és az alkoholos extraktumok eltérő módon képesek az emlőkarcinoma sejtek életképességét befolyásolni. Igaz, hogy ezeket az élettani hatásokat *in vitro* sejttenyésztéseken figyeltem meg, de mindenképpen köthető az eltérő bioaktív hatóanyag-tartalmakhoz. Továbbá fontos kiemelni, hogy az emlőkarcinoma sejttenyésztéseken megfigyelt koncentráció-függő hormetikus hatás, az elképzeléseim szerint, közelebb áll a normális sejtekhez, mivel az, az adaptív stresszválasz(ok) létre utal. Így feltételezhető, hogy a vizes articsóka és görögszéna extraktumok növelhetik a normális sejtek adaptív stresszválaszainak hatékonyságát. Amennyiben ez a feltételezés *in vivo* igazolást nyer, úgy a vizes articsóka és görögszéna extraktumok alkalmazása inkább a rákos megbetegedések prevenciójával lenne kapcsolatos. Másfelől, amennyiben a szerves articsóka és görögszéna extraktumok citotoxicitása *in vivo* tesztrendszerben is megerősítést nyer, úgy a rákos betegségek komplementer terápiájában lehet jelentősége.

A fenti megfontolások arra ösztönöztek, hogy *in vivo* modellrendszert alkalmazva vizsgáljam az általam készített extraktumokat. E tekintetben, a napjainkban legjobban ismert soksejtű eukarióta fajt, a *Drosophila melanogaster*-t alkalmaztam, amely lehetővé tette az általam készített extraktumok citotoxikus és genotoxikus hatásainak *in vivo* tanulmányozását. Kiderült, hogy a kivonatok az alkalmazott koncentrációkban nem befolyásolták az ecetmuslicák életképességét, és nem mutattak citotoxikus hatást. Ugyankor az is kiderült, hogy nem növelik meg a kromoszómatörések és pontmutációk gyakoriságát, azaz nem genotoxikusak. Ezek az eredmények reménykeltőek, mert azt sugallják, hogy a normális eukarióta sejtek esetében, az articsóka és görögszéna kivonatok nem csökkentik az életképességét, és nem is okoznak genetikai terheltséget növelő szomatikus mutációkat.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Az új tudományos eredményeimet az alábbiakban összegzem:

1. A szárított articsóka levelekből készített vizes és alkoholos kivonataimban azonosított 49, illetve 51 féle bioaktív hatóanyag közül összesen 27 vegyületet először én azonosítottam be articsókából, névszerint: kinurénsav, trigonellin, sztahidrin (alkaloidok); 4-Guanidino-vajsav, arginin, triptofán, N-Acetil-izoleucin, N-Acetil-leucin (aminosavak); eszkulin, 5-O-Caffeoylshikimic sav I, 5-O-Caffeoylshikimic sav II, Coumaroylquinic sav I, Coumaroylquinic sav II (polifenolok); diosmetin, salvigenin, naringin-dihidro-kalkon, vicenin-2 (flavonoidok); 7-Metoxi-4-metilkumarin (kumarin); kolin, fahéjsav-metilészter, fenetilamin (egyéb metabolitok); urzolsav (terpenoid); sztearidonsav metilészter, sztearidonsav etilészter (szteroidok); pantoténsav (B5), piridoxál, piridoxin (B6) (vitaminok).
2. A magyar görögszénamagból készített vizes kivonatomban 54, míg az alkoholos kivonatomban 67 bioaktív hatóanyagot azonosítottam be, melyek közül összesen 25 vegyület először került kimutatásra, névszerint: ekgonin, ekgonin metilészter (alkaloidok); rezveratrol (polifenol); tricín-7-O-glükozid, genisztéin, izovitexin (apigenin-6-C-glükozid), medikarpin, szkoparin, apigenin-6-C-glükozid-8-C-ramnozid (flavonoidok); szotolon, szacharopin (egyéb metabolitok); 5'-S-Metil-5'-tioadenozin, 2'-deoxiadenozin, adenin, adenzin, adenzin 3',5'-ciklikus-monofoszfát (cAMP), citidin, flavin mononukleotid (FMN), guanin, guanozin, S-adenozil-homocisztein, uridin, xantin (purinok és pirimidinek); urzolsav (terpenoid); nikotinamid (vitamin).
3. A különböző koncentrációjú vizes articsóka és görögszéna extraktumok T-47D és ZR-75-1 humán emlőkarcinóma sejtvonalakon történt 48- és 72 órás tesztelésének eredményei bifázisos jellegű viabilitásra utalnak.
4. A különböző koncentrációjú alkoholos articsóka és görögszéna extraktumok T-47D és ZR-75-1 humán emlőkarcinóma sejtvonalakon történt 48- és 72 órás tesztelésének eredményei citotoxicitás - apoptózis összefüggésre utalnak.

5. A *Drosophila melanogaster*-re alapozott viabilitási tesztek alapján kijelenthető, hogy a vizes és alkoholos articsóka, valamint görögszéna kivonatok, úgy koncentrált, mint hígított formában nem rendelkeznek citotoxikus hatással. A SMART tesztrendszerre alapozott kísérletek eredményei alapján megállapítható, hogy a koncentrált vizes és alkoholos articsóka, illetve görögszéna kivonatok nem rendelkeznek genotoxikus hatással.

8. GYAKORLATBAN ALKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK

A kutatási eredményeim alapján kijelenthető, hogy az általam készített articsóka és görögszéna extraktumok az emlődaganatok tükrében alkalmasak lehetnek preventív és/vagy terápiás jellegű funkcionális élelmiszerek és nutraceutikumok kifejlesztésére.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A disszertációmban azokról a kutatásokról számolok be, amelyek az articsóka és a görögszéna beltartalmi értékei, illetve élettani hatásai közötti összefüggésekre irányulnak. Első lépésként vizes és alkoholos extraktumokat készítettem szárított articsókalevélből és görögszénamagból, majd tanulmányoztam azok bioaktív hatóanyagait (UHPLC-ESI-MS), valamint meghatároztam összpolidifenol- és összflavonoid-tartalmukat, illetve *in vitro* antioxidáns kapacitását (UV-VIS spektrofotométer). Az articsóka és görögszéna extraktumok élettani hatásait tanulmányozva megállapítottam, hogy a vizes és alkoholos kivonataim nem befolyásolják kedvezőtlenül a *Drosophila melanogaster* életképességét, azaz *in vivo* nem citotoxikusak és nem növelik meg sem a kromozómátörések sem a pontmutációk gyakoriságát, vagyis nem genotoxikusak (SMART teszrendszer). Továbbá megállapítottam, hogy a vizes és alkoholos kivonatok eltérő módon befolyásolják a humán emlőkarcinoma sejtvonalak életképességét (MTT viabilitás/proliferációs teszt). A vizes extraktumok bifázisos hatása egyszerre utal kis koncentráció esetén az adaptív stresszválaszok hatékonyságának növelésére, míg nagy koncentráció esetén a proliferáció gátlásra. Az alkoholos extraktumok erőteljes *in vitro* citotoxicitása pedig apoptózis által indukált sejthalálra enged következtetni.

Mindent egybevetve, a kísérleti eredményeim arra utalnak, hogy mind az articsóka, mind a görögszéna extraktumok genotoxicitás nélküli tumorelles hatása egy olyan alap, amelyre ráépíthetők ezen növények humán prevenciós és/vagy terápiás alkalmazásai.

10. SUMMARY

In my doctoral dissertation the presented experimental data are meant to correlate the bioactive compounds content and generated biological effects of artichoke- and fenugreek extracts. Therefore, I have prepared aqueous- and alcoholic extracts from artichoke and fenugreek, then by chemomapping I have determined the bioactive compound profile, total polyphenol-, total flavonoid content and the *in vitro* antioxidant capacity of all extracts.

The *in vivo* studies of generated biological effects have shown that the artichoke- and fenugreek extracts do not reduce viability of *Drosophila melanogaster*, and are not cytotoxic nor genotoxic since they fail to increase the chromosomal breakage and gene mutation rate.

The *in vitro* studies have revealed that the aqueous- and alcoholic extracts do affect differently the viability of human breast carcinoma cell lines. The aqueous artichoke- and aqueous fenugreek extracts affect viability in biphasic manner, suggesting the concentration-dependent implication of adaptive stress response and cytotoxicity. The alcoholic artichoke- and alcoholic fenugreek extracts feature a pronounced cytotoxic effect across a wide concentration range that seems to be related to apoptosis induced cell death.

Taken together, all these data are suggesting that the artichoke and fenugreek extracts non-genotoxic but anti-tumoral effects represent a solid scientific ground in order to prove these plants potential usefulness in preventing and/or treating human conditions like cancer.

11. IRODALOMJEGYZÉK

- Adams D.O. – Yang S.F.: 1977. Methionine metabolism in apple tissue: implication of s-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Plant Physiology*. 60(6): 892-896.
- Adzet T. - Camarasa J. - Laguna J.C.: 1987. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes. *J Nat Prod*. 50(4): 612-617.
- Aggarwal B.B. - Gupta S.C. - Kim J.H.: 2012. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 119(3): 651-665.
- Aggarwal B.B. - Kunnumakkara A.B. - Harikumar K.B. - Tharakan S.T. - Sung B. - Anand P.: 2008. Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. *Planta Med*. 74(13):1560-1569.
- Al-Habori M. - Al-Aghbari A.M. - Al-Mamary M.: 1998. Effects of fenugreek seeds and its extracts on plasma lipid profile: a study on rabbits. *Phytother Res*. 12(8): 572-575.
- Al-Habori M. - Raman A.: 1998. Antidiabetic and hypocholesterolaemic effects of fenugreek. *Phytother Res*. 12(4): 233-242.
- Alsemari A. - Alkhodairy F. - Aldakan A. - Al-Mohanna M. - Bahoush E. - Shinwari Z. - Alaiya A.: 2014. The selective cytotoxic anti-cancer properties and proteomic analysis of *Trigonella Foenum-Graecum*. *BMC Complement Altern Med*. 14: 114.
- Alshatwi A.A. - Shafi G. - Hasan T.N. - Syed N.A. - Khoja K.K.: 2013. Fenugreek induced apoptosis in breast cancer MCF-7 cells mediated independently by fas receptor change. *Asian Pac J Cancer Prev*. 14(10): 5783-5788.
- American Cancer Society, Cancer Facts & Figures, Atlanta, 2016.
- Amin A. - Alkaabi A. - Al-Falasi S. - Daoud S.A.: 2005. Chemopreventive activities of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek) against breast cancer. *Cell Biol Int*. 29(8): 687-694.
- Amira S. - Rotondo A. - Mulé F.: 2008. Relaxant effects of flavonoids on the mouse isolated stomach: Structure-activity relationships. *European Journal of Pharmacology*. 599 (1-3): 126-130.

- Angelini A. - Di Pietro R. - Centurione L. - Castellani M.L. - Conti P. - Porreca E. - Cuccurullo F.: 2012. Inhibition of P-glycoprotein-mediated transport by S-adenosylmethionine and cynarin in multidrug-resistant human uterine sarcoma MES-SA/Dx5 cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 26(3): 495-504.
- Arlt A. - Sebens S. - Krebs S. - Geismann C. - Grossmann M. - Kruse M.L. – Schreiber S. - Schäfer H.: 2013. Inhibition of the Nrf2 transcription factor by the alkaloid trigonelline renders pancreatic cancer cells more susceptible to apoptosis through decreased proteasomal gene expression and proteasome activity. *Oncogene*. 32(40): 4825-4835.
- Ashokkumar P. - Sudhandiran G.: 2008. Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 62(9): 590-597.
- Assad T. - Khan R.A.: 2016. Effect of methanol extract of *Trigonella foenum-graecum* L. seeds on anxiety, sedation and motor coordination. *Metab Brain Dis*. doi:10.1007/s11011-016-9914-y.
- Baghy K.: 2011. A decorin szerepe a máj fibrogenezisében és karcinogenezisében. Doktori (Ph.D.) értekezés. Semmelweis Egyetem Patológiai Doktori Iskola. Budapest.
- Bandyopadhyay G. - Bera T. - Yang J. - Guzman R. - Nandi S.: 1996. Isolation of a cDNA for the human homolog of MAT-1 oncogene and its expression in human breast cancer cells. *Oncol Rep*. 3(1): 137-140.
- Beecher G.R.: 2003. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake 2003. *The Journal of Nutrition*. 133: 3248S-3254S.
- Benayad Z. - Gómez-Cordovés C. - Es-Safi N.E.: 2014. Characterization of flavonoid glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) crude seeds by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. *International journal of molecular sciences*. 15(11): 20668-20685.
- Bencsik T.: 2011. A magyar gyógyszerkönyv (*Ph. Hg. VIII.*) új gyógynövényei. *Farmakognóziák hírek*. VI.(19): 4-5.
- Ben Salem M. - Affes H. - Ksouda K. - Dhouibi R. - Sahnoun Z. - Hammami S. - Zeghal K.M.: 2015. Pharmacological Studies of Artichoke Leaf Extract and Their Health Benefits. *Plant Foods Hum Nutr*. 70(4): 441-453.

- Bernard M.M. - McConnery J.R. - Hoskin D.W.: 2017. [10]-Gingerol, a major phenolic constituent of ginger root, induces cell cycle arrest and apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Exp Mol Pathol.* 102(2): 370-376.
- Bernhard R.: 1972. Identification of L-asparagine in artichokes *Cynara Scolymus*. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie.* 5: 185-186.
- Betancor-Fernandez A. - Perez-Galvez A. - Sies H. - Stahl W.: 2003. Screening pharmaceutical preparations containing extracts of turmeric rhizome, artichoke leaf, devil's claw root and garlic or salmon oil for antioxidant capacity. *J. Pharm. Pharmacol.* 55(7): 981-986.
- Bordás I. - Tompa A.: 2006. Mérgező növények, növényi mérgek. Országos Kémiai Biztonsági Intézet, Budapest. 5.
- Boross L. – Sajgó M.: 2003. A biokémia alapjai. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 23-26.
- Bravo L.: 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 56(11): 317-333.
- Broca C. - Breil V. - Cruciani-Guglielmacci C. - Manteghetti M. - Rouault C. – Derouet M. - Rizkalla S. - Pau B. - Petit P. - Ribes G. - Ktorza A. - Gross R. - Reach G. - Taouis M.: 2004. Insulinotropic agent ID-1101 (4-hydroxyisoleucine) activates insulin signaling in rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287(3): E463-E471.
- Brown J.E. - Rice-Evans C.A.: 1998. Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro. *Free Radic Res.* 29(3): 247-255.
- Brown M. - Tsodikov A. - Bauer K.R.: 2008. The role of human epidermal growth factor receptor 2 in the survival of women with estrogen and progesterone receptor-negative, invasive breast cancer: the California Cancer Registry, 1999–2004. *Cancer.* 112: 737–747.
- Bruhat A. - Chérasse Y. - Chaveroux C. - Maurin A.C. - Jousse C. - Fafournoux P.: 2009. Amino acids as regulators of gene expression in mammals: molecular mechanisms. *Biofactors.* 35(3): 249-257.
- Cabaton N. - Dumont C. - Severin I. - Perdu E. - Zalko D. - Cherkaoui-Malki M. - Chagnon M.C.: 2009. Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicology.* 255(1-2): 15-24.
- Calabrese E.J.: 1999. Evidence that hormesis represents an “overcompensation” response to a disruption in homeostasis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42: 135-137.

- Calabrese E.J. - Baldwin L.A.: 1999. Chemical hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis. *Toxicol. Pathol.* 27: 195-216.
- Calabrese E.J. - Baldwin L.A.: 2000. Radiation hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis. *Hum. Exp. Toxicol.* 19: 41-75.
- Calabrese V. - Cornelius C. - Dinkova-Kostova A.T. - Iavicoli I. - Di Paola R. - Koverech A. - Cuzzocrea S. - Rizzarelli E. - Calabrese E.J.: 2012. Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in ageing and longevity. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1822: 753-783.
- Cao G. - Sofic E. - Prior R.L.: 1997. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids; structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine.* 22: 749-760.
- Chatterjee S. - Kumar M. - Kumar A.: 2012. Chemomodulatory Effect of *Trigonella foenum graecum* (L.) Seed Extract on Two Stage Mouse Skin Carcinogenesis. *Toxicol Int.* 19(3): 287-294.
- Chen Y.Y. – Lee M.H. – Hsu C.C. – Wei C.L. – Tsai Y.C.: 2012. Methyl cinnamate inhibits adipocyte differentiation via activation of the CaMKK2-AMPK pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 60 (4): 955-963.
- Choi E.J. - Kim G.H.: 2009. Apigenin causes G2/M arrest associated with the modulation of p21^{Cip1} and Cdc2 and activates p53-dependent apoptosis pathway in human breast cancer SK-BR-3 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 20(4): 285-290.
- Choi K.C. – Son Y.O. – Hwang J.M. – Kim B.T. – Chae M. – Lee J.C.: 2016. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-septic potential of phenolic acids and flavonoid fractions isolated from *Lolium multiflorum*. *Pharmaceutical Biology.* 55(1): 611-619.
- Deák V.: 2014. Általános genetika. Typotex Kiadó. Budapest.
- de Rijke E. - Out P - Niessen W.M. - Ariese F. - Gooijer C. - Brinkman U.A.: 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A.* 1112(1): 31-63.
- Devasena T. - Menon V.P.: 2002. Enhancement of circulatory antioxidants by fenugreek during 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol Biophys.* 6(4): 289-292.

- Devasena T. - Menon V.P.: 2003. Fenugreek affects the activity of beta-glucuronidase and mucinase in the colon. *Phytother Res.* 17(9): 1088-1091.
- Dési I.: 2001. Népegészségtan. Semmelweis Kiadó, Budapest. 440.
- Dietz B.M. - Hajirahimkhan A. - Dunlap T.L. - Bolton J.L.: 2016. Botanicals and Their Bioactive Phytochemicals for Women's Health. *Pharmacol Rev.* 68(4), 1026-1073.
- Ding H. - Wang H. - Zhu L. - Wei W.: 2016. Ursolic Acid Ameliorates Early Brain Injury After Experimental Traumatic Brain Injury in Mice by Activating the Nrf2 Pathway. *Neurochemical Research.* doi:10.1007/s11064-016-2077-8.
- Dixit M. – Raghuvanshi A.: – Gupta C.P. – Kureel J. – Mansoori M.N. – Shukla P. – John A.A. -Singh K. - Purohit D - Awasthi P. - Singh D. - Goel A.: 2015. Medicarpin, a Natural Pterocarpan, Heals Cortical Bone Defect by Activation of Notch and Wnt Canonical Signaling Pathways. *PLoS One.* 10(12): e0144541.
- Dominy J.E. - Lee Y. - Jedrychowski M.P. - Chim H. - Jurczak M.J. - Camporez J.P. - Ruan H.B. - Feldman J. - Pierce K. - Mostoslavsky R. - Denu J.M. - Clish C.B. - Yang X. - Shulman G.I. - Gygi S.P. - Puigserver P.: 2012. The deacetylase Sirt6 activates the acetyltransferase GCN5 and suppresses hepatic gluconeogenesis. *Mol Cell.* 48(6): 900-913.
- Duarte J. - Perez-Vizcaino F. - Utrilla F. - Jimenez J. - Tamargo J. - Zarzuelo A.: 1993. Vasolidatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *General Pharmacology.* 24: 857-862.
- Dunnick J. – Hailey J.R.: 1992. Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. *Fundam. Appl. Toxicol.* 19: 423-431.
- Elkady A.I. - Abuzinadah O.A - Baeshen N.A. - Rahmy T.R.: 2012. Differential control of growth, apoptotic activity, and gene expression in human breast cancer cells by extracts derived from medicinal herbs *Zingiber officinale*. *J Biomed Biotechnol.* 2012:614356.
- Fekete J.: 2002. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC). [In.: Kőmíves J.: Környezeti analitika.] Műegyetemi Kiadó. Budapest. 194-195.
- Fintelmann V.: 1996a. Antidyspeptic and lipid-lowering effects of artichoke leaf extract - results of clinical studies into the efficacy and tolerance of Hepar-SL forte involving 553 patients. *J Gen Med.* 2: 3-19.

- Fintelmann V.: 1996b. Therapeutic profile and mechanism of action of artichoke leaf extract: hypolipemic, antioxidant, hepatoprotective, and choleric properties. *Phytomedica*. 201: 50-60.
- Flammang A.M. - Cifone M.A. - Erexson G.L. - Stankowski L.F. Jr.: 2004. Genotoxicity testing of a fenugreek extract. *Food Chem*. 42(11): 1769-1775.
- Ford C.H. - Al-Bader M. - Al-Ayadhi B. - Francis I.: 2011. Reassessment of estrogen receptor expression in human breast cancer cell lines. *Anticancer Res*. 31(2): 521-527.
- Frankel E.N. - Meyer A.S.: 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80. 1925-1941.
- Gai W.T. – Yu D.P. – Wang X.S. – Wang P.T.: 2016. Anti-cancer effect of ursolic acid activates apoptosis through ROCK/PTEN mediated mitochondrial translocation of cofilin-1 in prostate cancer. *Oncology Letters*. 12 (4): 2880-2885.
- Gao F. - Du W. - Zafar M.I. - Shafqat R.A. - Jian L. - Cai Q. - Lu F.: 2015. 4-Hydroxyisoleucine ameliorates an insulin resistant-like state in 3T3-L1 adipocytes by regulating TACE/TIMP3 expression. *Drug Des Devel Ther*. 9: 5727-5736.
- Gao J.L. - Shui Y.M. - Jiang W. - Huang E.Y. - Shou Q.Y. - Ji X. - He B.C. - Lv G.Y. - He T.C.: 2016. Hypoxia pathway and hypoxia-mediated extensive extramedullary hematopoiesis are involved in ursolic acid's anti-metastatic effect in 4T1 tumor bearing mice. *Oncotarget*. 7 (44): 71802-71816.
- Gatouillat G. – Magid A.A. – Bertin E. - El btaouri H. – Morjani H. - Lavaud C. - Madoulet C.: 2015. Medicarpin and millepurpan, two flavonoids isolated from *Medicago sativa*, induce apoptosis and overcome multidrug resistance in leukemia P388 cells. *Phytomedicine*. 22(13): 1186-1194.
- Gautam S. - Ishrat N. - Yadav P. - Singh R. - Narender T. - Srivastava A.K.: 2016. 4-Hydroxyisoleucine attenuates the inflammation-mediated insulin resistance by the activation of AMPK and suppression of SOCS-3 coimmunoprecipitation with both the IR- β subunit as well as IRS-1. *Mol Cell Biochem*. 414(1-2): 95-104.
- Gebhardt R. 1995. Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 144(2): 279-286.

- Gebhardt R.: 1996. Inhibition of hepatic cholesterol biosynthesis by artichoke leaf extracts is mainly due to luteolin. *Cell Biol. Toxicol.* 10: 89-150.
- Gebhardt R. - Fausel M.: 1997. Antioxidant and hepatoprotective effects of artichoke extracts and constituents in cultured rat hepatocytes. *Toxicol in Vitro.* 11: 669-672.
- Gilardini Montani M.S. - Prodosmo A. - Stagni V. - Merli D. - Monteonofrio L. – Gatti V. - Gentileschi M.P. - Barilà D. - Soddu S.: 2013. ATM-depletion in breast cancer cells confers sensitivity to PARP inhibition. *J Exp Clin Cancer Res.* 32: 95.
- Gominak S.C.: 2016. Vitamin D deficiency changes the intestinal microbiome reducing B vitamin production in the gut. The resulting lack of pantothenic acid adversely affects the immune system, producing a "pro-inflammatory" state associated with atherosclerosis and autoimmunity. *Medical Hypotheses.* 94: 103-107.
- Goyal S. - Gupta N. - Chatterjee S.: 2016. Investigating Therapeutic Potential of *Trigonella foenum-graecum* L. as Our Defense Mechanism against Several Human Diseases. *J Toxicol.* 2016: 1250387.
- Grangrade H. - Kaushal R.: 1979. Fenugrin-B, a saponin from *Trigonella foenum-graecum* Linn. *Indian Drugs.* 16(7): 149.
- Gupta S.: 2017. Anti inflammatory and anti arthritic activity of different milk based formulation of curcumin in rat model. *Curr Drug Deliv.* doi: 10.2174/1567201814666170320142851.
- Hallman K. - Aleck K. - Dwyer B. - Lloyd V. - Quigley M. - Sitto N. - Siebert A.E. - Dinda S.: 2017. The effects of turmeric (curcumin) on tumor suppressor protein (p53) and estrogen receptor (ER α) in breast cancer cells. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 9: 153-161.
- Hamza A.A. - Elwy H.M. - Badawi A.M.: 2016. Fenugreek seed extract attenuates cisplatin-induced testicular damage in Wistar rats. *Andrologia.* 48(2): 211-221.
- He M. – Min J.W. – Kong W.L. – He X.H. – Li J.X. - Peng B.W.: 2016. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia.* 115: 74-85.
- Hegazy M.G. - Emam M.A.: 2015. Ethanolic extract of *Trigonella Foenum Graecum* attenuates cisplatin-induced nephro- and hepatotoxicities in rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 61(7): 81-87.
- Hibasami H. - Moteki H. - Ishikawa K. - Katsuzaki H. - Imai K. - Yoshioka K. - Ishii Y. - Komiya T.: 2003. Protodioscin isolated from fenugreek (*Trigonella*

- foenumgraecum L.) induces cell death and morphological change indicative of apoptosis in leukemic cell line H-60, but not in gastric cancer cell line KATO III. *Int J Mo Med.* 11(1): 23-26.
- Hinou J. – Harvala C. – Philianos S.: 1989. [Polyphenolic substances of *Cynara scolymus* L. leaves]. *Annales Pharmaceutiques Francaises.* 47 (2): 95-98.
- Hodjat M - Baeri M. - Rezvanfar M.A. - Rahimifard M. - Gholami M. - Abdollahi M.: 2017. On the mechanism of genotoxicity of ethephon on embryonic fibroblast cells. *Toxicol Mech Methods.* 27(3): 173-180.
- Hoffman R.S. – Kaplan J.L. – Hung O.L. – Goldfrank L.R.: 2004. Ecgonine methyl ester protects against cocaine lethality in mice. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology.* 42(4): 349-354.
- Holliday D.L. - Speirs V.: 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 13(4): 215.
- Hou Y. - Wu J. - Huang Q. - Guo L.: 2009. Luteolin inhibits proliferation and affects the function of stimulated rat synovial fibroblasts. *Cell Biology International.* 33(2): 135-147.
- Huang D. - Ou B. - Prior R.L.: 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53: 1841-1856.
- Huber J.: 2015. Nitrogéntartalmú ösztrom származékok előállítása és tumorellenes hatásának *in vitro* vizsgálata. Doktori értekezés. Szegedi Tudományegyetem, Szerves Kémiai Tanszék. 4-5.
- Huovinen M. - Loikkanen J. - Myllynen P. - Vähäkangas K.H.: 2011. Characterization of human breast cancer cell lines for the studies on p53 in chemical carcinogenesis. *Toxicol In Vitro.* 25(5): 1007-1017.
- Jasso-Padilla I. - Juárez-Flores B. - Alvarez-Fuentes G. - De la Cruz-Martínez A. - González-Ramírez J. - Moscosa-Santillán M. - González-Chávez M. - Oros-Ovalle C. - Prell F. - Czermak P. - Martinez-Gutierrez F.: 2017. Effect of prebiotics of *Agave salmiana* fed to healthy Wistar rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 97(2): 556-563.
- Jesus M. - Martins A.P. - Gallardo E. - Silvestre S.: 2016. Diosgenin: Recent Highlights on Pharmacology and Analytical Methodology. *J Anal Methods Chem.* 2016: 4156293.

- Jetté L. - Harvey L. - Eugeni K. - Levens N.: 2009. 4-Hydroxyisoleucine: a plant-derived treatment for metabolic syndrome. *Curr Opin Investig Drugs*. 10(4): 353-358.
- Jimenez-Escrig A. - Dragsted L.O. - Daneshvar B. - Pulido R. - Saura-Calixto F.: 2003. In vitro antioxidant activities of edible artichoke (*Cynara scolymus* L.) and effect on biomarkers of antioxidants in rats. *J Agric Food Chem*. 51(18): 5540-5545.
- Joshi D.V. - Patil R.R. - Naik S.R.: 2015. Hydroalcohol extract of *Trigonella foenum-graecum* seed attenuates markers of inflammation and oxidative stress while improving exocrine function in diabetic rats. *Pharm Biol*. 53(2): 201-211.
- Joyce E.F. - Erceg J. - Wu C.T.: 2016. Pairing and anti-pairing: a balancing act in the diploid genome. *Curr Opin Genet Dev*. 37: 119-128.
- Kang H. - Ku S.K. - Jung B. - Bae J.S.: 2015. Anti-inflammatory effects of vicenin-2 and scolymoside in vitro and in vivo. *Inflammation Research*. 64 (12): 1005-1021.
- Kang L.P. - Zhao Y. - Pang X. - Yu H.S. - Xiong C.Q. - Zhang J. - Gao Y. - Yu K. - Liu C. - Ma B.P.: 2013. Characterization and identification of steroidal saponins from the seeds of *Trigonella foenum-graecum* by ultra high-performance liquid chromatography and hybrid time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses*. 74: 257-267.
- Kaviarasan S. - Sundarapandiyam R. - Anuradha C.V.: 2008. Protective action of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed polyphenols against alcohol-induced protein and lipid damage in rat liver. *Cell Biol Toxicol*. 24(5): 391-400.
- Kaviarasan S. - Vijayalakshmi K. - Anuradha C.V.: 2004. Polyphenol-rich extract of fenugreek seeds protect erythrocytes from oxidative damage. *Plant Foods Hum Nutr*. 59(4): 143-147.
- Kawase M. - Sakagami H. - Motohashi N. - Hauer H. - Chatterjee S.S. - Spengler G. - Vigyikanne A.V. - Molnar A. - Molnar J.: 2005. Coumarin derivatives with tumor-specific cytotoxicity and multidrug resistance reversal activity. *In Vivo*. 19: (4) 705-712.
- Khanna P. - Jain S.C.: 1973. Diosgenin, gitogenin and tigogenin from *Trigonella foenum-graecum* tissue cultures. *Lloydia*. 36: 96-98.
- Khoja K.K. - Shaf G. - Hasan T.N. - Syed N.A. - Al-Khalifa A.S. - Al-Assaf A.H. - Alshatwi A.A.: 2011. Fenugreek, a naturally occurring edible spice, kills MCF-7

- human breast cancer cells via an apoptotic pathway. *Asian Pac J Cancer Prev.* 12(12): 3299-3304.
- Kékesi G. - Horváth Gy.: 2002. A kinurénsav fájdalomcsillapító hatása. *Ideggyógyászati Szemle.* 55(9-10): 313-322.
- Kim D.O. - Chun O.K. - Kim Y.J. - Moon H.Y. - Lee C.Y.: 2003. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51(22): 6509-6515.
- Kiyota E. - Pena I.A. - Arruda P.: 2015. The saccharopine pathway in seed development and stress response of maize. *Plant, Cell and Environment.* 38(11): 2450-2461.
- Kmeťová J. - Skoršepa M. - Vydrová M.: 2011. Kémia. Vydavateľstvo Matice slovenskej. 18-19.
- Kopper L. – Schaff Zs.: 2006. Patológia. Medicina Könyvkiadó Zrt. Budapest. 281.
- Kraft K.: 1997. Artichoke leaf extract - Recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. *Phytomedicine.* 4(4): 369-378.
- Kroon T. - Baccega T. - Olsén A. - Gabrielsson J. - Oakes N.D.: 2017. Nicotinic acid timed to feeding reverses tissue lipid accumulation and improves glucose control in obese Zucker rats[S]. *Journal of Lipid Research.* 58 (1): 31-41.
- Ku S.K. – Bae J.S.: 2016. Vicenin-2 and scolymoside inhibit high-glucose-induced vascular inflammation in vitro and in vivo. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 94(3): 287-295.
- Kumar P. - Bhandari U.: 2013. Protective effect of *Trigonella foenum-graecum* Linn. on monosodium glutamate-induced dyslipidemia and oxidative stress in rats. *Indian J Pharmacol.* 45(2): 136-140.
- Kumar S.A. - Ward L.C. - Brown L.: 2016. Inulin oligofructose attenuates metabolic syndrome in high-carbohydrate, high-fat diet-fed rats. *The British Journal of Nutrition.* 116(9): 1502-1511.
- Lee J. - Durst R.W. - Wrolstad R.E.: 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International.* 88(5): 1269-1278.
- Lee K.S. - Lee B.S. - Semnani S. - Avanesian A. - Um C.Y. - Jeon H.J. - Seong K.M. - Yu K. - Min K.J. - Jafari M.: 2010. Curcumin extends life span, improves health span, and modulates the expression of age-associated aging genes in *Drosophila melanogaster*. *Rejuvenation Res.* 13(5): 561-570.

- Lemos C.L. - Sampaio P. - Maiato H. - Costa M. - Omel'yanchuk V.L. - Liberal V. - Sunkel C.E.: 2000. Mast, a conserved microtubule-associated protein required for bipolar mitotic spindle organization. *EMBO J.* 19: 3668–3682.
- Li H. - Xia N. - Brausch I. - Yao Y. - Forstermann U.: 2004. Flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) up-regulate endothelial-type nitric-oxide synthase gene expression in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 310(3): 926-932.
- Li W. - Wang Y. - Wang X. - Zhang H. - He Z. - Zhi W. - Liu F. - Niu X.: 2016. Gastroprotective effect of esculin on ethanol-induced gastric lesion in mice. *Fundamental and Clinical Pharmacology.* doi: 10.1111/fcp.12255.
- Lietti A.: 1977. Choleric and cholesterol lowering properties of two artichoke extracts. *Fitoterapia.* 48: 153-158.
- Lim C.K. - Fernández-Gomez F.J. – Braidly N. – Estrada C. - Costa C. - Costa S. - Bessede A - Fernandez-Villalba E. - Zinger A. - Herrero M.T. – Guillemin G.J.: 2016. Involvement of the kynurenine pathway in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology.* pii: S0301-0082(15)30055-1.
- Lima F.J. – Cosker F. – Brito T.S. - Ribeiro-Filho H.V. - Silva C.M. - Aragão K.S. - Lahlou S. - Souza M.H. - Santos A.A. - Magalhães P.J.: 2014. Antispasmodic and myorelaxant effects of the flavoring agent methyl cinnamate in gut: potential inhibition of tyrosine kinase. *European Journal of Pharmacology.* 740: 192-199.
- Liu T.F. - Vachharajani V.T. - Yoza B.K. - McCall C.E.: 2012. NAD⁺-dependent sirtuin 1 and 6 proteins coordinate a switch from glucose to fatty acid oxidation during the acute inflammatory response. *J Biol Chem.* 287(31): 25758-25769.
- Liu J. – Wen X. – Liu B. – Zhang Q. – Zhang J. – Miao H. – Zhu R.: 2016. Diosmetin inhibits the metastasis of hepatocellular carcinoma cells by downregulating the expression levels of MMP-2 and MMP-9. *Molecular Medicine Reports.* 13(3): 2401-2408.
- Liu Y. - Gibson G.R. - Walton G.E.: 2016. An In Vitro Approach to Study Effects of Prebiotics and Probiotics on the Faecal Microbiota and Selected Immune Parameters Relevant to the Elderly. *PLoS One.* 11(9): e0162604.
- Liu F. - Prabhakar M. - Ju J. - Long H. - Zhou H.W.: 2017. Effect of inulin-type fructans on blood lipid profile and glucose level: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *European Journal of Clinical Nutrition.* 71(1): 9-20.

- Llorach R. - Espin J.C. - Tomas-Barberan F.A. - Ferreres F.: 2002. Artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *J Agric Food Chem.* 50(12): 3458-3464.
- Lopez-Molina D. - Navarro-Martinez M.D. - Rojas-Melgarejo F. - Hiner A.N. - Chazarra S. - Rodriguez-Lopez J. N.: 2005. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Phytochemistry.* 66(12): 1476-1484.
- Lopez T.E. - Pham H.M. - Barbour J. - Tran P. - Van Nguyen B. - Hogan S.P. - Homo R.L. - Coskun V. - Schriener S.E. - Jafari M.: 2016a. The impact of green tea polyphenols on development and reproduction in *Drosophila melanogaster*. *J Funct Foods.* 20: 556-566.
- Lopez T.E. - Pham H.M. - Nguyen B.V. - Tahmasian Y. - Ramsden S. - Coskun V. - Schriener S.E. - Jafari M.: 2016b. Green tea polyphenols require the mitochondrial iron transporter, mitoferrin, for lifespan extension in *Drosophila melanogaster*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 93(4): 210-221.
- Lugasi A.: 2001. Élelmiszer eredetű antioxidánsok hatása primer és szekunder prevencióban: Állatkísérletes és humán kísérletek. Doktori értekezés. Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar. 24.
- Lupattelli G. - Marchesi S. - Lombardini R. - Roscini A.R. - Trinca F. - Gemelli F. - Vaudo G. - Mannarino E.: 2004. Artichoke juice improves endothelial function in hyperlipemia. *Life Sci.* 76(7): 775-782.
- Lutz M. – Henríquez C. – Escobar M.: 2011. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *Journal of Food Composition and Analysis.* 24: 49-54.
- Machado N.M. - de Rezende A.A. - Nepomuceno J.C. - Tavares D.C. - Cunha W.R. - Spanó M.A.: 2016. Evaluation of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of (+)-usnic acid in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol.* 96: 226-233.
- Machovich R.: 2004. Az aminosavak anyagcséréje. Orvosi Biokémia. Medicina, Budapest. 220.
- Magielse J. – Verlaet A. – Breynaert A. – Keenoy B.M. – Apers S. - Pieters L. – Hermans N.: 2014. Investigation of the in vivo antioxidative activity of *Cynara scolymus* (artichoke) leaf extract in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Molecular Nutrition and Food Research.* 58(1): 211-215.

- Maheshwari A. - Verma N. - Swaroop A. - Bagchi M. - Preuss H.G. - Tiwari K. - Bagchi D.: 2017. Efficacy of Furosap TM, a novel *Trigonella foenum-graecum* seed extract, in Enhancing Testosterone Level and Improving Sperm Profile in Male Volunteers. *Int J Med Sci.* 14(1): 58-66.
- Mao Y. – Varoglu M. – Sherman D.H.: 1999. Molecular characterization and analysis of the biosynthetic cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. *Chemistry and Biology.* 6: 251-263.
- Marabini L. - Calò R. - Fucile S.: 2011. Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2). *Toxicol In Vitro.* 5: 1045-1052.
- Maurya C.K. - Singh R. - Jaiswal N. - Venkateswarlu K. - Narender T. – Tamrakar A.K.: 2014. 4-Hydroxyisoleucine ameliorates fatty acid-induced insulin resistance and inflammatory response in skeletal muscle cells. *Mol Cell Endocrinol.* 395(1-2): 51-60.
- Máthé E. - Kraft C. - Giet R. - Deák P. - Peters J.M. - Glover D.M.: 2004. The E2-C vihar is required for the correct spatiotemporal proteolysis of cyclin B and itself undergoes cyclical degradation. *Curr Biol.* 14(19): 1723-1733.
- Mbarki S. - Alimi H. - Bouzenna H. - Elfeki A. - Hfaiedh N.: 2017. Phytochemical study and protective effect of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek seeds) against carbon tetrachloride-induced toxicity in liver and kidney of male rat. *Biomed Pharmacother.* 88. 19-26.
- Mehrafarin A. - Qaderi A. - Rezazadeh Sh. - Naghdi B.H. - Noormohammadi G. - Zand E.: 2010. Bioengineering of Important Secondary Metabolites and Metabolic pathways in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Journal of Medicinal Plants.* 9 (35): 1-18.
- Mehta K. - Pantazis P. - McQueen T. - Aggarwal B.B.: 1997. Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines. *Anticancer Drugs.* 8(5): 470-81.
- Mester I.: 2010. Fitoterápia. Gyógynövénygyógyászat. Vizsgáló felkészítő segédanyag. 72-73.
- Miccadei S. - Di Venere D. - Cardinali A. - Romano F. - Durazzo A. - Foddai M.S. - Fraioli R. - Mobarhan S. - Maiani G.: 2008. Antioxidative and apoptotic properties of polyphenolic extracts from edible part of artichoke (*Cynara*

- scolymus L.*) on cultured rat hepatocytes and on human hepatoma cells. *Nutr Cancer*. 60(2): 276-283.
- Mileo A.M. - Di Venere D. - Linsalata V. - Fraioli R. - Miccadei S.: 2012. Artichoke (*Cynara scolymus L.*) polyphenols induce apoptosis and decrease the invasive potential of the Human Breast Cancer Cell Line MDA-MB231. *J Cell Physiol*. 227(9): 3301-3309.
- Mileo A.M. - Di Venere D. - Abbruzzese C. - Miccadei S.: 2015. Long Term Exposure to Polyphenols of Artichoke (*Cynara scolymus L.*) Exerts Induction of Senescence Driven Growth Arrest in the MDA-MB231 Human Breast Cancer Cell Line. *Oxid Med Cell Longev*. 2015:363827.
- Mitchel R.E.J.: 2007. Low doses of radiation reduce risk in vivo. *Dose Response*. 5: 1-10.
- Mocellin S. - Briarava M. - Pilati P.: 2016. Vitamin B6 and Cancer Risk: A Field Synopsis and Meta-Analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 109(3): pii: djw230.
- Mohammadi A. - Gholamhosseinian A. - Fallah H.: 2016. *Trigonella foenum-graecum* water extract improves insulin sensitivity and stimulates PPAR and γ gene expression in high fructose-fed insulin-resistant rats. *Adv Biomed Res*. 5: 54.
- Mokdad Bzeouich I. – Mustapha N. – Maatouk M. – Ghedira K. - Ghoul M. - Chekir-Ghedira L.: 2016. Genotoxic and anti-genotoxic effects of esculin and its oligomer fractions against mitomycin C-induced DNA damages in mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 82: 48-52.
- Mollet P. - Wurgler F.E.: 1974. Detection of somatic recombination and mutation in *Drosophila*: A method for testing genetic activity of chemical compounds. *Mutat. Res*. 25: 421–424.
- Molyneux P.: 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*. 26: 211-219.
- Moradi N. - Moradi K.: 2013. Physiological and pharmaceutical effects of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum L.*) as a multipurpose and valuable medicinal plant. *Global Journal of Medicinal Plant Research*. 1(2): 199-206.
- Morais de C.R. - Bonetti A.M. - Carvalho S.M. - de Rezende A.A. - Araujo G.R. – Spanó M.A.: 2016. Assessment of the mutagenic, recombinogenic and carcinogenic

- potential of fipronil insecticide in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*. 165: 342-351.
- Mosmann T.: 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*. 65 (1-2): 55-63.
- Mucaji P. – Grancai D. – Nagy M. - Buděšínský M. - Ubik K.: 2001. [Monodesmosidic saponins in *Cynara cardunculus* L.]. *Ceska a Slovenska Farmacie*. 50(6): 277-279.
- Murakami T. - Kishi, A. - Matsuda H. - Yoshikawa, M.: 2000. Medicinal foodstuffs. XVII. Fenugreek seed. (3): Structures of new furostanol-type steroid saponins, trigoneosides Xa, Xb, XIb, XIIa, XIIb and XIIIa from seeds of Egyptian *Trigonella foenum-graecum* L. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 48(7): 994–1000.
- Naicker N. - Nagiah S. - Phulukdaree A. - Chuturgoon A.: 2016. *Trigonella foenum-graecum* Seed Extract, 4-Hydroxyisoleucine, and Metformin Stimulate Proximal Insulin Signaling and Increase Expression of Glycogenic Enzymes and GLUT2 in HepG2 Cells. *Metab Syndr Relat Disord*. 14(2): 114-120.
- Naidu P.B. - Ponmurugan P. - Begum M.S. - Mohan K. - Meriga B. - RavindarNaik R. - Saravanan G.: 2015. Diosgenin reorganises hyperglycaemia and distorted tissue lipid profile in high-fat diet-streptozotocin-induced diabetic rats. *J Sci Food Agric*. 95(15): 3177-3182.
- Nadova E. - Miadokova P. - Mucaji D. - Grancai L.C.: 2008. Growth inhibitory effect of ethyl acetate-soluble fraction of *Cynara scolymus* L. leaf extract in leukemia cells involves cell arrest, cytochrome c release and activation of caspases. *Phytother. Res*. 22: 165-180.
- Negro D. - Montesano V. - Grieco S. - Crupi P. - Sarli G. - De Lisi A. - Sonnante G.: 2012. Polyphenol compounds in artichoke plant tissues and varieties. *Journal of Food Science*. 77 (2): C244-252.
- Nguyen C. – Savouret J.F. – Widerak M. - Corvol M.T. - Rannou F.: 2017a. Resveratrol, Potential Therapeutic Interest in Joint Disorders: A Critical Narrative Review. *Nutrients*. 9(1). pii: E45.
- Nguyen L.T. - Lee Y.H. - Sharma A.R. - Park J.B. - Jagga S. - Sharma G. - Lee S.S. - Nam J.S.: 2017b. Quercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triple-

- negative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity. *Korean J Physiol Pharmacol.* 21(2): 205-213.
- Nishina A. – Ukiya M. – Fukatsu M. – Koketsu M. – Ninomiya M. – Sato D. – Yamamoto J. - Kobayashi-Hattori K. - Okubo T. - Tokuoka H. - Kimura H.: 2015. Effects of Various 5,7-Dihydroxyflavone Analogs on Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. *Biologyval & Pharmaceutical Bulletin.* 38(11): 1794-1800.
- Noori S. – Hassan Z.M. – Yaghmaei B. – Dolatkah M.: 2013. Antitumor and immunomodulatory effects of salvigenin on tumor bearing mice. *Cellular Immunology.* 286(1-2): 16-21.
- Ombódi A. – Pestiné N.O.: 2011. Az articsóka és hazai termesztésének lehetőségei. *Agrofórum extra.* 38: 21-26.
- Ouzir M. - El Bairi K. - Amzazi S.: 2016. Toxicological properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Food Chem Toxicol.* 96: 145-154.
- Owusu C. - Buist D.S. - Field T.S. - Lash T.L. - Thwin S.S. - Geiger A.M. - Quinn V.P. - Frost F. - Prout M. - Yood M.U. - Wei F. - Silliman R.A.: 2008. Predictors of tamoxifen discontinuation among older women with estrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 26(4): 549–555.
- Özyürek M. - Bektaşoğlu B. - Güclü K. - Apak R.: 2009. Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Analytica Chimica Acta.* 636 (1): 42-50.
- Pamukcu A.M. - Yalciner S. - Hatcher J. - Bryan G.T.: 1980. Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Res.* 40: 3468-3472.
- Parvizpur A. - Ahmadiani A. - Kamalinejad M.: 2004. Spinal serotonergic system is partially involved in antinociception induced by *Trigonella foenum-graecum* (TFG) leaf extract. *J Ethnopharmacol.* 95(1): 13-17.
- Parvizpur A. - Ahmadiani A. - Kamalinejad M.: 2006. Probable role of spinal purinoceptors in the analgesic effect of *Trigonella foenum* (TFG) leaves extract. *J Ethnopharmacol.* 104(1-2): 108-112.
- Patel K. – Gadewar M. – Tahilyani V. – Patel D.K.: 2013. A review on pharmacological and analytical aspects of diosmetin: a concise report. *Chinese Journal of Integrative Medicine.* 19 (10): 792-800.

- Patil V. – S. M. - Sharma S. - Pratap K. - Singh D. - Padwad Y.S.: 2015. Synergistic effect of curcumin and piperine in suppression of DENA-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 40(2): 445-452.
- Pawar R.S. - Grundel E.: 2016. Overview of regulation of dietary supplements in the USA and issues of adulteration with phenethylamines (PEAs). *Drug Testing and Analyses.* doi: 10.1002/dta.1980.
- Peraza-Luna F. - Rodríguez-Mendiola M. - Arias-Castro C. - Bessiere J.M. - Calva-Calva G.: 2001. Sotolone production by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* in airlift with mesh bioreactors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 49(12): 6012-6019.
- Pereira C. – Barros L. – Carvalho A.M. - Santos-Buelga C. – Ferreira I.C.: 2015. Infusions of artichoke and milk thistle represent a good source of phenolic acids and flavonoids. *Food and Function.* 6 (1): 56-62.
- Pereira Dos Santos Nascimento M.V. - Arruda-Silva F. - Gobbo Luz A.B. - Baratto B. - Venzke D. - Mendes B.G. - Fröde T.S. - Geraldo Pizzolatti M. - Dalmarco E.M.: 2016. Inhibition of the NF- κ B and p38 MAPK pathways by scopoletin reduce the inflammation caused by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* 38 (5): 344-352.
- Petit P.R. - Sauvaire Y. - Ponsin G. - Manteghetti M. - Fave A. - Ribes G.: 1993. Effects of a fenugreek seed extract on feeding behaviour in the rat: metabolic-endocrine correlates. *Pharmacol Biochem Behav.* 45(2): 369-374.
- Petit P.R. - Sauvaire Y.D. - Hillaire-Buys D.M. - Leconte O.M. - Baissac Y.G. – Ponsin G.R. - Ribes G.R.: 1995. Steroid saponins from fenugreek seeds: extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. *Steroids.* 60 (10): 674-680.
- Petropoulos G.A.: 2002. Fenugreek – The genus *Trigonella*. Taylor and Francis, London and New York, 9-17.
- Picci G.: 1959. Microbiological determinations of some vitamins and amino acids liberated during germination of the seeds. *Annali della Facoltà Agraria della Università di Pisa.* 20: 51-60.
- Piozzi F. - Paternostro M. - Passannanti S. - Gacs-Baitz E.: 1986. Triterpenes from *Amaracus dictamnus*. *Phytochemistry.* 25: 539-541.

- Pokol G. - Gyurcsányi E.R. - Simon A. - Bezúr L. - Horvai G. - Horváth V. - Dudás K.M.: 2011. "Infravörös (IR) spektroszkópia". *Analitikai Kémia*. Typotex Kiadó, Budapest. 270–280.
- Prokisch J.: 2010. *Funkcionális élelmiszerek hatóanyagai*, 1. Vitaminok. Center- Print Kft., Debrecen. 7-33.
- Pulito C. - Mori F. - Sacconi A. - Casadei L. - Ferraiuolo M. - Valerio M.C. - Santoro R. - Goeman F. - Maidecchi A. - Mattoli L. - Manetti C. - Di Agostino S. - Muti P. - Blandino G. - Strano S.: 2015. *Cynara scolymus* affects malignant pleural mesothelioma by promoting apoptosis and restraining invasion. *Oncotarget*. 6(20): 18134-18150.
- Raghuram T.C. - Sharma R.D. - Sivakumar B. - Sahay B.K.: 1994. Effect of fenugreek seeds on intravenous glucose disposition in non-insulin dependent diabetic patients. *Phytotherapy Research*. 8(2): 83-86.
- Rahmati - Yamchi M. - Ghareghomi S. - Haddadchi G. - Milani M. - Aghazadeh M. - Daroushnejad H.: 2014. Fenugreek extract diosgenin and pure diosgenin inhibit the hTERT gene expression in A549 lung cancer cell line. *Mol Biol Rep*. 41(9): 6247-6252.
- Raju J. - Patlolla J.M. - Swamy M.V. - Rao C.V.: 2004. Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 13(8): 1392-1398.
- Raju J. - Bird R.P.: 2006. Alleviation of hepatic steatosis accompanied by modulation of plasma and liver TNF-alpha levels by *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seeds in Zucker obese (fa/fa) rats. *Int J Obes (Lond)*. 30(8): 1298-1307.
- Rangboo V. - Noroozi M. - Zavoshy R. - Rezadoost S.A. - Mohammadpoorasl A.: 2016. The Effect of Artichoke Leaf Extract on Alanine Aminotransferase and Aspartate Aminotransferase in the Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Int J Hepatol*. doi: 10.1155/2016/4030476.
- Rawal S. - Singh P. - Gupta A. - Mohanty S.: 2014. Dietary intake of *Curcuma longa* and *Embllica officinalis* increases life span in *Drosophila melanogaster*. *Biomed Res Int*. 2014: 910290.
- Recommended Dietary Allowances 10th Edition. 1989. National Academy Press. Washington, D.C. 52-77.

- Reppel L. - Wagenbreth D.: 1958. Untersuchungen über den Gehalt an Cumarinen und diesen verwandten Säuren in Pflanzungen zwischen *Melilotus albus* Med. und *Trigonella foenum-graecum*. *Flora*. 146. 212–227.
- Rubovszky G. - Horváth Zs: 2011. Az emlődaganat endokrin kezelése során fellépő egyes menopauzális jellegű panaszok és azok kezelési lehetőségei. *Magyar Onkológia*. 55: 235–242.
- Ryle C.M. - Bretkreutz D. - Stark H.J. - Leigh I.M. - Steinert P.M. - Roop D. – Fusenig N.E.: 1989. Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation*. 40(1): 42–54.
- Safaa H.M. - Hanaa H.A. - Abdelrazik H.F. - Nahla S.A. - Abdelaaty A.S.: 2013. *Cynara scolymus* for relieving on nonalcoholic steatohepatitis induced in rats. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*. 1: 57-66.
- Samochowiec L.: 1962. The action of herbs and roots of artichokes (*Cynara scolymus*) and cardoon (*Cynara cardunculus*) on the development of experimental atherosclerosis in white rats. *Diss Pharm*. 14: 115.
- Saravana K.J. - Eko S. - Mahitosh M.: 2013. Events associated with apoptotic effect of *p*-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cell. *World Journal of Gastroenterology*. 19(43): 7726–7734.
- Sas K. - Robotka H. - Toldi J. - Vécsei L.: 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *Journal of the Neurological Sciences*. 257(1-2): 221-239.
- Sato T. – Ito Y. – Nagasawa T.: 2015. Attenuation of autophagic-proteolysis in C2C12 cells by saccharopine. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 410(1-2): 93-100.
- Sattiraju V. - Chandrashekar K.S.: 2014. Isolation and Characterization of Chemical Constituentss from *Trigonella foenum-graecum* Seed Extract. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 6(4): 715-718.
- Saturnino R.S. - Machado N.M. - Lopes J.C. - Nepomuceno J.C.: 2017. Assessment of the mutagenic, recombinogenic, and carcinogenic potential of amphotericin B in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Drug Chem Toxicol*. 9: 1-7.
- Sauvaire Y. - Ribes G. - Baccou J.C. - Loubatieres-Mariani M.M.: 1991. Implication of steroid saponins and sapogenins in the hypocholesterolemic effect of fenugreek. *Lipids*. 26(3): 191-197.

- Sauvaire Y. - Petit P. - Broca C. - Manteghetti M. - Baissac Y. - Fernandez-Alvarez J. - Gross R. - Roye M. - Leconte A. - Gomis R. - Ribes G.: 1998. 4-Hydroxyisoleucine: a novel amino acid potentiator of insulin secretion. *Diabetes*. 47(2): 206-210.
- Scholtes C. – Nizet S. – Collin S.: 2015. How sotolon can impart a Madeira off-flavor to aged beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(11): 2886-2892.
- Sebastian K.S. - Thampan R.V.: 2007. Differential effects of soybean and fenugreek extracts on the growth of MCF-7 cells. *Chem Biol Interact*. 170(2): 135-43.
- Serni E. - Audino V. - Del Carlo S. - Manera C. - Saccomanni G. - Macchia M.: 2013. Determination of water-soluble vitamins in multivitamin dietary supplements and in artichokes by micellar electrokinetic chromatography. *Natural Product Research*. 27(23): 2212-2215.
- Servillo L. - D'Onofrio N. - Longobardi L. - Sirangelo I. - Giovane A. - Cautela D. - Castaldo D. - Giordano A. - Balestrieri M.L.: 2013. Stachydrine ameliorates high-glucose induced endothelial cell senescence and SIRT1 downregulation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 114(11): 2522-2530.
- Shabbeer S. - Sobolewski M. - Anchoori R.K. - Kachhap S. - Hidalgo M. - Jimeno A. - Davidson N. - Carducci M.A. - Khan S.R.: 2009. Fenugreek: a naturally occurring edible spice as an anticancer agent. *Cancer Biol Ther*. 8(3): 272-278.
- Shafiee G. – Saidijam M. – Tavailani H. - Ghasemkhani N. - Khodadadi I.: 2016. Genistein Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation of HT29 Colon Cancer Cells. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. 5(3): 178-191.
- Sharma N. - Pulito C. - Klambauer G. - Mattoli L. - Strano S. - Blandino G. - Lucci J. - Bender A.: 2016. Anti-mesothelioma mechanism of action studies of a complex *Cynara scolymus* fraction using in silico target prediction and gene expression profiling. *Planta Med*. 81(S01): S1-S381.
- Sharma S. - Mishra V. - Jayant S.K. - Srivastava N.: 2015. Effect of *Trigonella foenum graecum* L on the Activities of Antioxidant Enzyme and Their Expression in Tissues of Alloxan-Induced Diabetic Rats. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 20(3): 203-211.
- Shekher Pannala A. - Chan T.S. - O'Brien P.J. - Rice-Evans C.A.: 2001. Flavonoids B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 282: 1161-1168.

- Shehzad A. – Lee J. – Lee Y.S.: 2013a. Curcumin in various cancers. *Biofactors*. 39(1): 56-68.
- Shehzad A. – Rehman G. – Lee Y.S.: 2013b. Curcumin in inflammatory diseases. *Biofactors*. 39(1): 69-77.
- Shi H. - Shi H. - Ren F. - Chen D. - Chen Y. - Duan Z.: 2016. Naringin in Ganshuang Granule suppresses activation of hepatic stellate cells for anti-fibrosis effect by inhibition of mammalian target of rapamycin. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. (doi: 10.1111/jcmm.12994.) 1-10.
- Simsek E.N. - Uysal T.: 2013. In vitro investigation of cytotoxic and apoptotic effects of *Cynara L.* species in colorectal cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 14(11): 6791-6795.
- Singh N.P. – Lai H.: 2001. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. *Life Sciences*. 70: 49-56.
- Singh P. - Vishwakarma S.P. - Singh R.L.: 2014. Antioxidant, oxidative DNA damage protective and antimicrobial activities of the plant *Trigonella foenum-graecum*. *J Sci Food Agric*. 94(12): 2497-2504.
- Singleton V.L. - Rossi J.A.: 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158.
- Skalta H.: 2002. Chemical constituents. In Petropoulos G.A.: Fenugreek - The Genus *Trigonella*. Taylor & Francis, London UK. 132-160.
- Soares Neto J.L. - de Carli R.F. - Kotzal Q.S. - Latroni F.B. - Lehmann M. - Dias J.F. - de Souza C.T. - Niekraszewicz L.A. - da Silva F.R. - da Silva J. - Dihl R.R.: 2016. Surface Water Impacted by Rural Activities Induces Genetic Toxicity Related to Recombinagenic Events in Vivo. *Int J Environ Res Public Health*. 13(8). pii: E827.
- Sreeja S. - Anju V.S. - Sreeja S.: 2010. In vitro estrogenic activities of fenugreek *Trigonella foenum graecum* seeds. *Indian J Med Res*. 131: 814-819.
- Srinivasan S. - Koduru S. - Kumar R. - Venguswamy G. - Kyprianou N. – Damodaran C.: 2009. Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells. *Int J Cancer*. 125(4): 961-967.
- Srinivasan K.: 2014. Antioxidant potential of spices and their active constituents. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 54(3): 352-372.

- Stark A. - Madar Z.: 1993. The effect of an ethanol extract derived from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) on bile acid absorption and cholesterol levels in rats. *Br J Nutr.* 69(1): 277-287.
- Sung B. - Prasad S. - Yadav V.R.: 2012. Aggarwal BB, Cancer cell signaling pathways targeted by spice-derived nutraceuticals. *Nutr Cancer.* 64(2): 173-197.
- Surján A. - Kocsis Z. - Csík M. - Pintér A. - Török G. - Börzsönyi M. - Szabad J.: 1985. Analysis of the genotoxic activity of four N-nitroso compounds by the *Drosophila* mosaic test. *Mutat Res.* 144(3): 177-181.
- Sváb J.: 1993. *Trigonella foenum-graecum* – görögszéna [in.: Bernáth J. Vadon termő és termesztett gyógynövények. Mezőgazda Kiadó. 479-480.
- Swaroop A. - Jaipuria A.S. - Gupta S.K. - Bagchi M. - Kumar P. - Preuss H.G. - Bagchi D.: 2015. Efficacy of a Novel Fenugreek Seed Extract (*Trigonella foenum-graecum*, Furocyst) in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Int J Med Sci.* 12(10): 825-831.
- Szabad J.: 1986. A genetic assay for the detection of aneuploidy in the germ-line cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* 164(5): 305-326.
- Szabad J.: 2016. Gének és az egyedfejlődés elkezdődése. Semmelweis Kiadó. Budapest.
- Szabad J. - Bryant P.J.: 1982. The mode of action of "discless" mutations in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 93(1): 240-256.
- Szabad J. - Soós I. - Polgár G. - Héjja G.: 1983. Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal tests. *Mutat Res.* 113(2): 117-133.
- Szekeresné Sz.Sz.: 2014. Egyes növényi csírák összetételének és mikrobiológiai hatásának vizsgálata és táplálkozási jelentőségük. Doktori (Ph.D.) értekezés. Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar.
- Szilvássy B.: 2014. Élelmi növények polifenolkészletének vizsgálata tömegspektrometriás módszerekkel. Doktori (Ph.D.) értekezés Budapesti Corvinus Egyetem Alkalmazott Kémia Tanszék.
- Tabana Y.M. – Hassan L.E. – Ahamed M.B. – Dahham S.S. - Iqbal M.A. - Saeed M.A. – Khan M.S. - Sandai D. - Majid A.S. - Oon C.E. - Majid A.M.: 2016. Scopoletin, an active principle of tree tobacco (*Nicotiana glauca*) inhibits human tumor vascularization in xenograft models and modulates ERK1, VEGF- A, and FGF-2 in computer model. *Microvascular Research.* 107: 17-33.

- Taper H.S. - Roberfroid M.: 1999. Influence of inulin and oligofructose on breast cancer and tumor growth. *The Journal of Nutrition*. 129(7): 1488S-91S.
- Tavassoli Z. – Taghdir M. – Ranjbar B.: 2017. Renin inhibition by soyasaponin I: a potent native anti-hypertensive compound. *Journal of Biomolecular and Structure Dynamics*. 19: 1-11.
- Taylor A. – Schenkel L.C. – Yokich M. - Bakovic M.: 2016. Adaptations to excess choline in insulin resistant and Pcyt2 deficient skeletal muscle. *Biochemistry and Cell Biology*. 6: 1-9.
- Thirunavukkarasu V. - Anuradha C.V. - Viswanathan P.: 2003. Protective effect of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds in experimental ethanol toxicity. *Phytother Res*. 17(7): 737-743.
- Tompa A.: 2011. Daganatos betegségek előfordulása, a hazai és nemzetközi helyzet ismertetése. *Magyar Tudomány*. 11: 1333-1345.
- Tompa A.: 2012. A környezet szerepe a daganatok keletkezésében. *Magyar Tudomány*. 3: 306-321.
- Valerio F. - De Bellis P. - Lonigro, S. L. - Morelli, L. - Visconti A. - Lavermicocca P.: 2006. In vitro and in vivo survival and transit tolerance of potentially probiotic strains carried by artichokes in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(4): 3042-3045.
- Valette G. - Sauvaire Y. - Baccou J.C. - Ribes G.: 1984. Hypocholesterolaemic effect of fenugreek seeds in dogs. *Atherosclerosis*. 50(1): 105-111.
- van der Woude H. - Gliszczyńska-Swigło A. - Struijs K. - Smeets A. - Alink G.M. - Rietjens I.M.: 2003. Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. *Cancer Letters*. 200 (1): 41-47.
- Varshney I.P. - Sharma S.C.: 1966. Saponins and sapogenins: part XXXII. Studies on *Trigonella foenum-graecum* Linn. Seeds. *J Indian Chem Soc*. 43(8): 564-567.
- Varshney I.P. - Beg M.F.A.: 1978. Study of saponins from the seeds of *Trigonella foenum-graecum* Linn. *Indian Journal of Chemistry., Sect. B*. 16(12): 1134–1136.
- Venkataramani K.S.: 1950. The factors governing the vitamin C content of *Trigonella foenum-graecum*. *Proceedings of the Indian Academy Of Science*. 32B. 112-125.
- Verma N. - Usman K. - Patel N. - Jain A. - Dhakre S. - Swaroop A. - Bagchi M. - Kumar P. - Preuss H.G. - Bagchi D.: 2016. A multicenter clinical study to

- determine the efficacy of a novel fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum*) extract (FenfuTM) in patients with type 2 diabetes. *Food Nutr Res.* 60: 32382.
- Vijayakumar M.V. - Singh S. - Chhipa R.R. - Bhat M.K.: 2005. The hypoglycaemic activity of fenugreek seed extract is mediated through the stimulation of an insulin signalling pathway. *Br J Pharmacol.* 146(1): 41-48.
- Vogel E.: 1980. Genetical relationship between resistance to insecticides and procarcinogens in two *Drosophila* populations. *Arch Toxicol.* 43(3): 201-211.
- Vogel E.W. - Zijlstra J.A. - Blijleven W.G.H.: 1983. Mutagenic activity of selected aromatic amines and polycyclic hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 107: 53-77.
- Wang D. - Sun H. - Han Y. - Wang X. - Yuan C.: 1997. Studies on chemical constituents of stems and leaves of *Trigonella foenum-graecum* L. *Zhongguo Zhongyao Zazhi.* 22(8): 486-487.
- Wang M. - Simon J.E. - Aviles I.F. - He K. - Zheng Q.Y. - Tadmor Y.: 2003. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51 (3): 601-608.
- Wang X. - Zhang N. - Huo Q. - Sun M. - Lv S. - Yang Q.: 2013. Huaier aqueous extract suppresses human breast cancer cell proliferation through inhibition of estrogen receptor α signaling. *Int J Oncol.* 43(1): 321-328.
- Weber L.V. - Al-Refae K. - Wölk G. - Bonatz G. - Altmüller J. - Becker C. - Gisselmann G. - Hatt H.: 2016. Expression and functionality of TRPV1 in breast cancer cells. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 8: 243-252.
- Wegener T.: 1995. [About the therapeutic activity of the artichoke]. *Pflanzliche Gallentherapeutika.* 16: 81.
- Weng Ng W.T. - Shin J.S. - Roberts T.L. - Wang B. - Lee C.S.: 2016. Molecular interactions of polo-like kinase 1 in human cancers. *J Clin Pathol.* 69(7): 557-562.
- Wilken R. - Veena M.S. - Wang M.B. - Srivatsan E.S.: 2011. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer.* 10:12. doi: 10.1186/1476-4598-10-12.
- Wojcicki J.: 1978. Effect of 1,5-dicaffeoylquinic acid (cynarine) on cholesterol levels in serum and liver of acute ethanol-treated rats. *Drug Alcohol Depend.* 3(2): 143-145.

- Wu T.T. - Peters A.A. - Tan P.T. - Roberts-Thomson S.J. - Monteith G.R.: 2014. Consequences of activating the calcium-permeable ion channel TRPV1 in breast cancer cells with regulated TRPV1 expression. *Cell Calcium*. 56(2): 59-67.
- Xiao Y. - Su X. - Huang W. - Zhang J. - Peng C. - Huang H. - Wu X. - Huang H. - Xia M. - Ling W.: 2015. Role of S-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease and its potential epigenetic mechanism. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 67: 158-166.
- Yadav U.C. - Baquer N.Z.: 2014. Pharmacological effects of *Trigonella foenum-graecum* L. in health and disease. *Pharm Biol*. 52(2): 243-254.
- Yoshikawa M. - Murakami T. - Komatsu H. - Murakami N. - Yamahara J. - Matsuda H.: 1997. Medicinal foodstuffs. IV. Fenugreek seed. (1): structures of trigoneosides Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, and IIIb, new furostanol saponins from the seeds of Indian *Trigonella foenum-graecum* L. *Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*. 45(1): 81-87.
- Yoshikawa M. - Murakami T. - Komatsu H. - Yamahara, J. - Matsuda H.: 1998. Medicinal foodstuffs. VIII. Fenugreek seed. (2): Structures of six new furostanol saponins, trigoneosides IVa, Va, VI, Vb, VIIb and VIIIb from the seeds of Indian *Trigonella foenum-graecum* L. *Heterocycles*. 47(1): 397-405.
- Yoshinaga A. - Kajiya N. - Oishi K. - Kamada Y. - Ikeda A. - Chigwechokha P.K. - Kibe T. - Kishida M. - Kishida S. - Komatsu M. - Shiozaki K.: 2016. NEU3 inhibitory effect of naringin suppresses cancer cell growth by attenuation of EGFR signaling through GM3 ganglioside accumulation. *European Journal of Pharmacology*. 782: 21-29.
- Yu H. - Wu M. - Lu F.R. - Xie J. - Zheng N. - Qin Y. - Gao F. - Du W. - Jian L.M.: 2013. Effect of *Trigonella foenum-graecum* 4-hydroxyisoleucine on high-glucose induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes of mice. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 33(10): 1394-1399.
- Yuan E. - Liu B. - Ning Z. - Chen C.: 2009. Preparative separation of flavonoids in *Adinandra nitida* leaves by high-speed counter-current chromatography and their effects on human epidermal carcinoma cancer cells. *Food Chemistry*. 115 (3): 1158-1163.

- Zapolska-Downar D. - Zapolski-Downar A. - Naruszewicz M. - Siennicka A. - Krasnodebska B. - Koldziej B.: 2002. Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes. *Life Sci.* 71(24): 2897-2908.
- Zhao H. - Zhang M. - Zhou F. - Cao W. - Bi L. - Xie Y. - Yang Q. - Wang S.: 2016. Cinnamaldehyde ameliorates LPS-induced cardiac dysfunction via TLR4-NOX4 pathway: The regulation of autophagy and ROS production. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 101: 11-24.

Internet hivatkozások

- Internet1: <http://www.artichokerecipes.co.uk/what-part-of-the-artichoke-plant-is-eaten/> (2016.12.28.)
- Internet2: <https://hu.wikipedia.org/wiki/Görögszénana> (2016.12.28.)
- Internet3: <http://www.savoryspiceshop.com/spices/fenugreek-seeds> (2016.12.28.)
- Internet4: <https://hu.wikipedia.org/wiki/Pirimidin> (2017.05.08.)
- Internet5: <https://hu.wikipedia.org/wiki/Purin> (2017.05.08.)
- Internet6:
http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_521_Elelmiszer_kemia/ch10s02.html (2016.01.14.)
- Internet7: <http://www.gyogynovenyhatarozo.hu/kumarinok/> (2017.01.21.)
- Internet8: <http://szerves.science.unideb.hu/wp-content/uploads/2015/06/005-Lipidek.pdf> (2017.02.28.)
- Internet9:
http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Proteinbiotech_hu_book/ch04.html (2017.05.09.)
- Internet10: <https://drosi.wordpress.com/drosophila-melanogaster/> (2017.05.06.)
- Internet11: http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB_02/fig2_b1D.jpg (2017.04.17)

12. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/184/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Vigh Szabolcs
Neptun kód: SZABOLCS.VIGH
Doktori Iskola: Hankóczy Jenő Növénytermesztési, Kertészeti és Élelmiszertudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10035790

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Magyar nyelvű könyvrészletek (1)

1. **Vigh, S.**, Zsvér-Vadas, Z., Máthé, E.: Articsóka és görögszéna növényi kivonatok citogenetikai hatásvizsgálata hagyma gyökércsúcs merisztéma sejteken.
In: Őshonos- és tájfajták - Ökotermékek - Egészséges Táplálkozás - Vidékfejlesztés: A XXI. század mezőgazdasági stratégiái Konferencia. Szerk.: Irinyiné Oláh Katalin, Kosztyuné Krajnyák Edit, Tóth Csilla, Lajtos István, Nyíregyházi Egyetem, Nyíregyháza, 305-309, 2016.
ISBN: 9786155545696

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (7)

2. **Vigh, S.**, Cziáky, Z., Sinka, L. T., Pribac, C., Moş, L., Turcuş, V., Gálné Remenyik, J., Máthé, E.:
Analysis of phytoconstituent profile of fenugreek - *Trigonella foenum-graecum* L. - seed extracts.
Stud. Univ. Babeş-Bolyai Chem. "Accepted by Publisher", 1-20, 2017. ISSN: 1224-7154.
IF: 0.244 (2016)
3. **Vigh, S.**, Cziáky, Z., Sinka, L. T., Pribac, C., Moş, L., Turcuş, V., Máthé, E.: Antioxidant activity, total flavonoid, total phenolic and anthocyanin contents of *Cynara scolymus* L. leaves and *Trigonella foenum-graecum* L. seeds.
Annals of the Academy of Romanian Scientists Series on Science and Technology of Information. 6 (1), 174-179, 2017. ISSN: 2069-1149.
4. **Vigh, S.**, Cziáky, Z., Sinka, L. T., Pribac, C., Moş, L., Turcuş, V., Gálné Remenyik, J., Máthé, E.:
Comparative chemomapping of phytoconstituents from different extracts of globe artichoke - *Cynara scolymus* L.
Stud. Univ. Babeş-Bolyai Chem. "Accepted by Publisher", 1-17, 2017. ISSN: 1224-7154.
IF: 0.244 (2016)

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. □ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: www.lib.unideb.hu



5. **Vigh, S.**, Zsvér-Vadas, Z., Pribac, C., Moş, L., Cziáky, Z., Czapár, M., Mihali, C., Turcuş, V., Máthé, E.: Artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts are showing concentration-dependent hormetic and cytotoxic effects on breast cancer cell lines.
Stud. Univ. "Vasile Goldiş" Arad, Ser. Ştiinţ. vieţii. 26 (4), 423-433, 2016. ISSN: 1584-2363.
6. **Vigh, S.**, Zsvér-Vadas, Z., Pribac, C., Moş, L., Cziáky, Z., Czapár, M., Mihali, C., Turcuş, V., Gálné Remenyik, J., Máthé, E.: Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) extracts are inducing dose-dependent hormetic response and cytotoxic effects in case of human breast cancer cell lines.
Stud. Univ. "Vasile Goldiş" Arad, Ser. Ştiinţ. vieţii. 26 (4), 435-448, 2016. ISSN: 1584-2363.
7. Máthé, E., Moş, L., Szőke-Kovács, Z., Szőke-Kovács, R., **Vigh, S.**, Pribac, C., Czapár, M., Oláh, C.: Plant extracts affect dose-dependently the hatching rate of *Drosophila melanogaster* but do not induce chromosome loss and/or aneuploidy.
Anal. Univ. Oradea Fac. Ecotoxicologie, Zootehnie şi Tehnologii de Industrie Alimentară. 11B, 399-404, 2012. ISSN: 1583-4301.
8. Czapár, M., Domina, R., **Vigh, S.**, Máthé, E., Pribac, G., Moş, L., Damian, S., Turcuş, V., Covaci, A., Cotoraci, C., Paiusan, L.: Effects of some plant extracts on various tumor cell lines.
Stud. Univ. "Vasile Goldiş" Arad, Ser. Ştiinţ. vieţii. 20 (1), 29-35, 2010. ISSN: 1584-2363.

További közlemények

Magyar nyelvű könyvrészletek (1)

9. **Vigh, S.**, Czapár, M., Tarek, M., Máthé, E., Dinya, Z.: Elfelejtett táplálékunk a tejsavó: A tejsavó kémiai összetételének és humán rákos sejtvonalak proliferációjára gyakorolt hatásának vizsgálata.
In: A IV. nyíregyházi doktorandusz (PhD/DLA) konferencia kiadványa. Szerk.: Semsei Imre, Mikóné Márton Julianna, Debreceni Egyetemi Kiadó, Debrecen, 225-229, 2010. ISBN: 9789633181744

Idegen nyelvű közlemények külföldi folyóiratban (1)

10. Pribac, G., Czapár, M., **Vigh, S.**, Dinya, Z., Nagyné Uhrin, H., Szathmáry, M., Steiber, Z., Máthé, E., Ardelean, A., Moş, L., Bodó, E.: Apoptosis on colorectal HT-29 cancer cells may be induced by bioactive principles of *Dioscorea* Sp. extracts.
Annals Romanian Soc Cell Biol. 14 (2), 33-37, 2009. ISSN: 1583-6258.



Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (2)

11. **Vigh, S.**: Növényi hatóanyagok tesztelése humán emlőtumoros sejtvonalakon.
In: Aktualitások a táplálkozástudományi kutatásokban című V. PhD konferencia
Összefoglalói. Szerk.: Gelencsér Éva, Horváth Zoltánné, Magyar Táplálkozástudományi Társaság, Budapest, 10, 2015. ISBN: 9789638810885
12. Czapár, M., **Vigh, S.**, Dinya, Z., Nagyné Uhrin, H., Szathmáry, M., Steiber, Z., Máthé, E., Bodó, E.: Természetes növényi hatóanyagok tumorelles hatásainak vizsgálata kolorektális eredetű HT-29 sejtvonalon.
In: VIII. Magyar Genetikai Kongresszus, XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok : program, összefoglalók. Szerk.: Maróy Péter, Sass Miklós, Putnoky Péter, Magyar Genetikusok Egyesülete, Szeged, 143-144, 2009.

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (1)

13. Czapár, M., Pribac, G., Domina, R., **Vigh, S.**, Máthé, E., Ardelean, A., Turcuş, V., Damian, S., Moş, L., Cotoraci, C.: Effects of some plant extracts on HT-29 colorectal adenocarcinoma cell line.
In: 20th Edition of the International Conference Arad Academic Days : Book of Abstracts.
Coord.: Liana Mos, George Pribac, Vasile Goldis University Press, Arad, 20, 2010. ISBN: 9789736643972

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 0,488

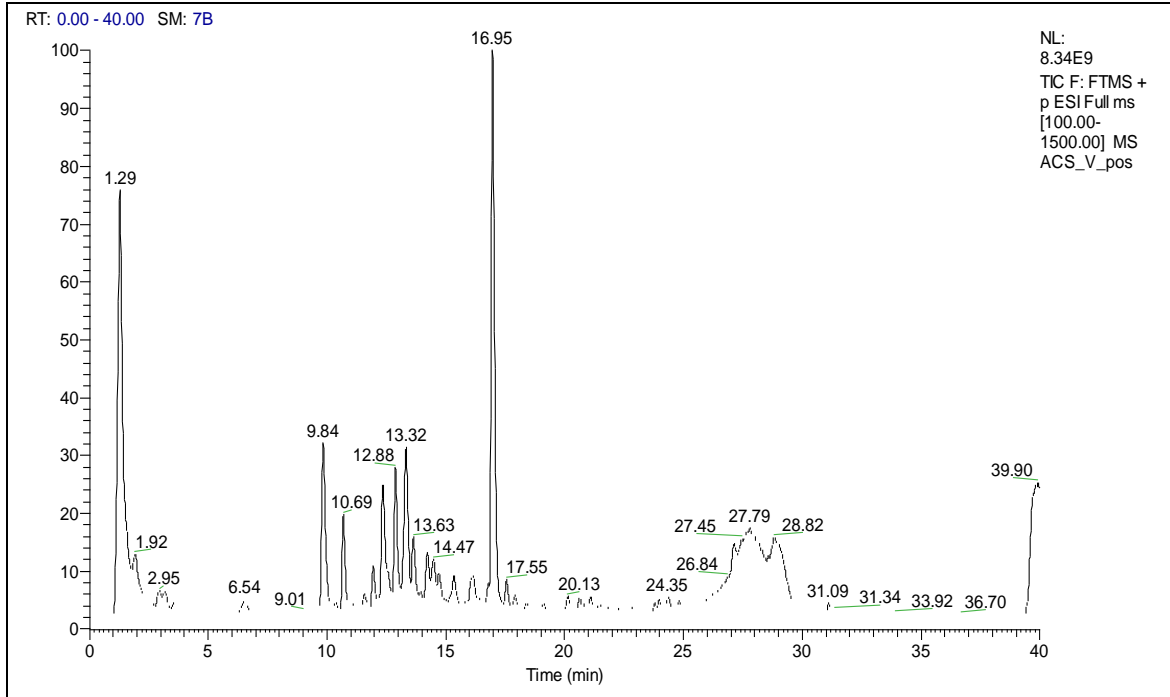
**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
0,488**

Debrecen, 2017.06.16.

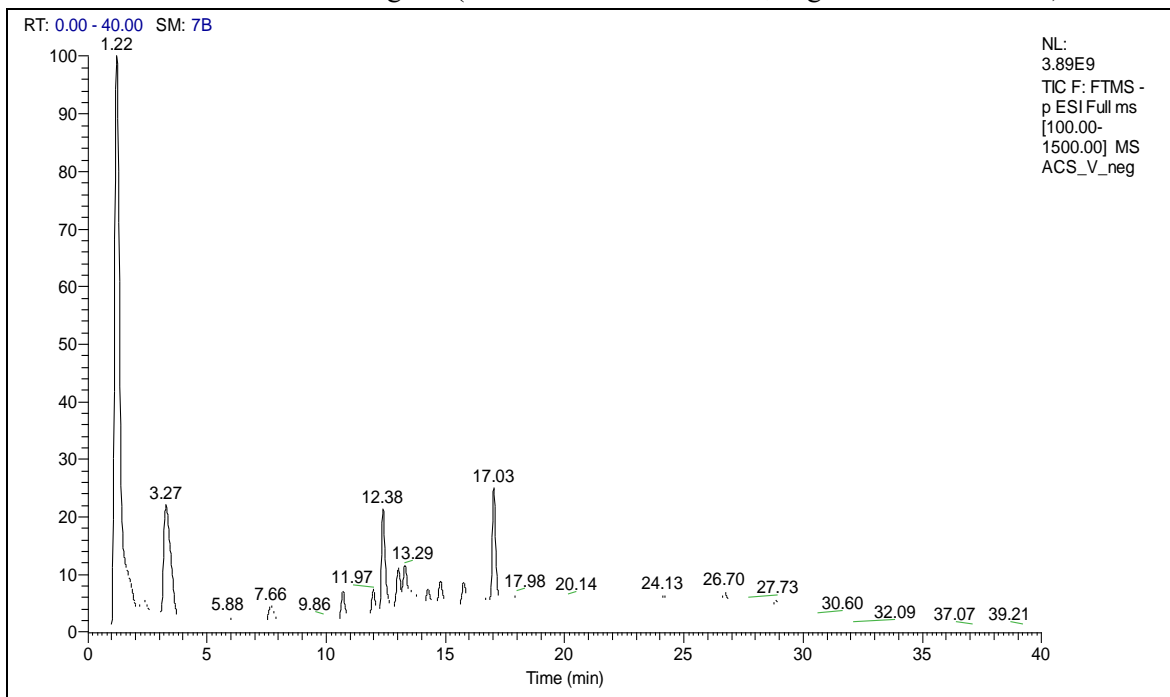


13. MELLÉKLETEK

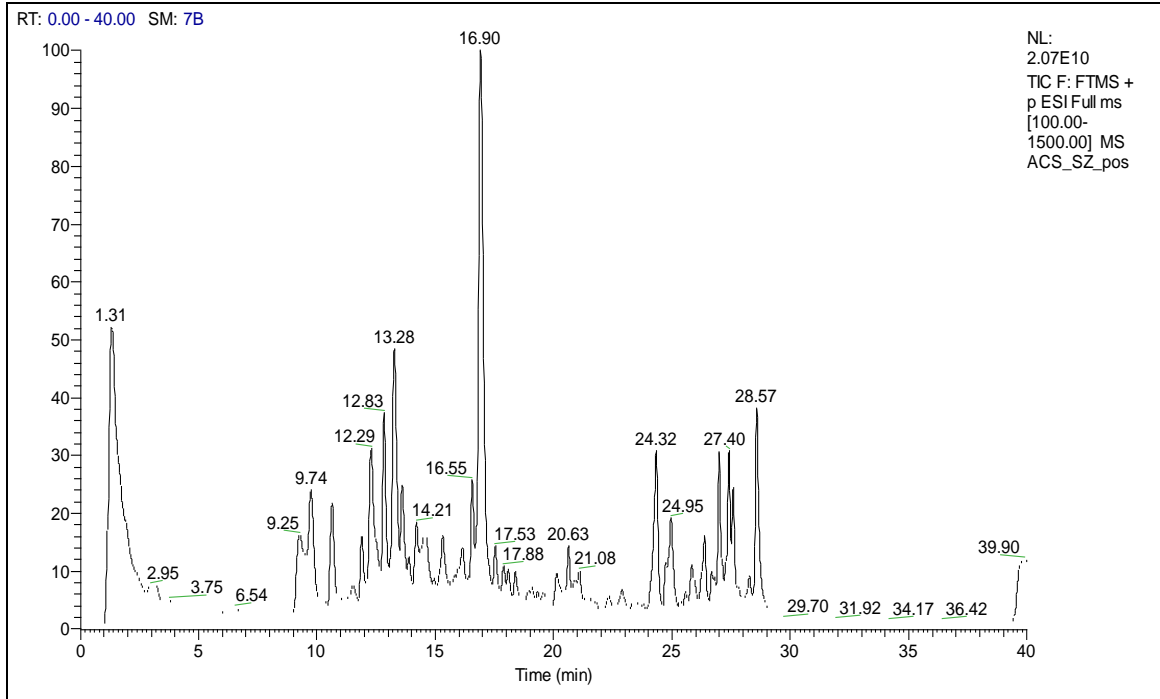
1. melléklet: Totál ion kromatogram (vizes articsóka extraktum, pozitív ionizációs mód)



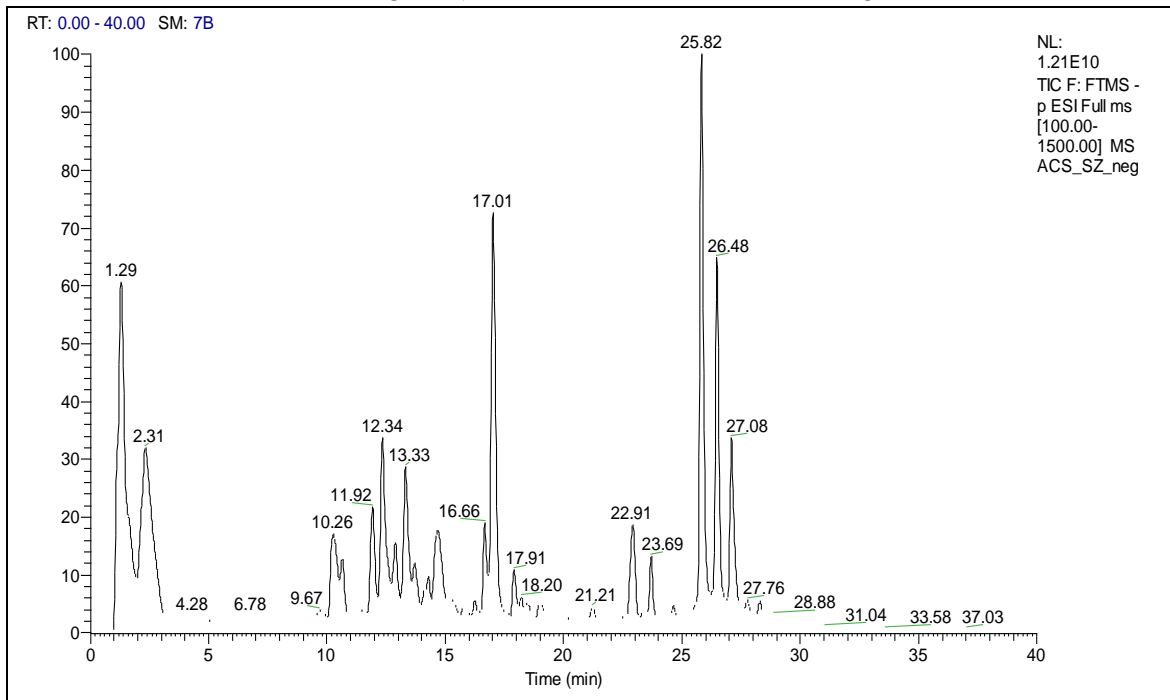
2. melléklet: Totál ion kromatogram (vizes articsóka extraktum, negatív ionizációs mód)



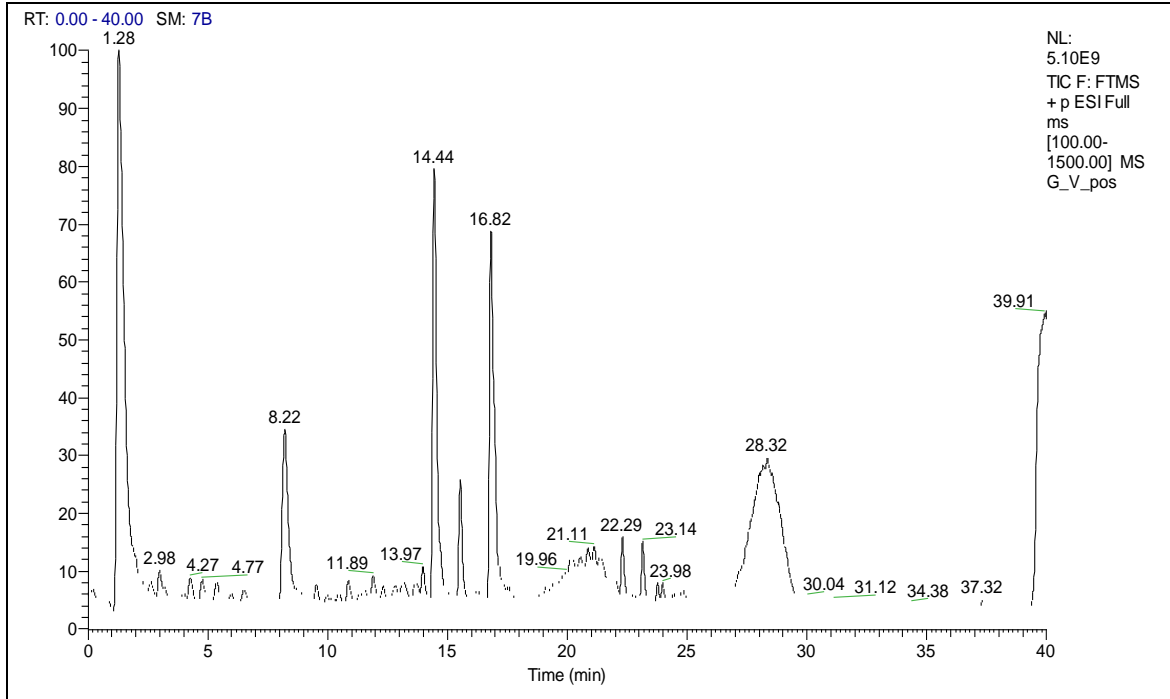
3. melléklet: Totál ion kromatogram (alkoholos articsóka extraktum, pozitív ionizációs mód)



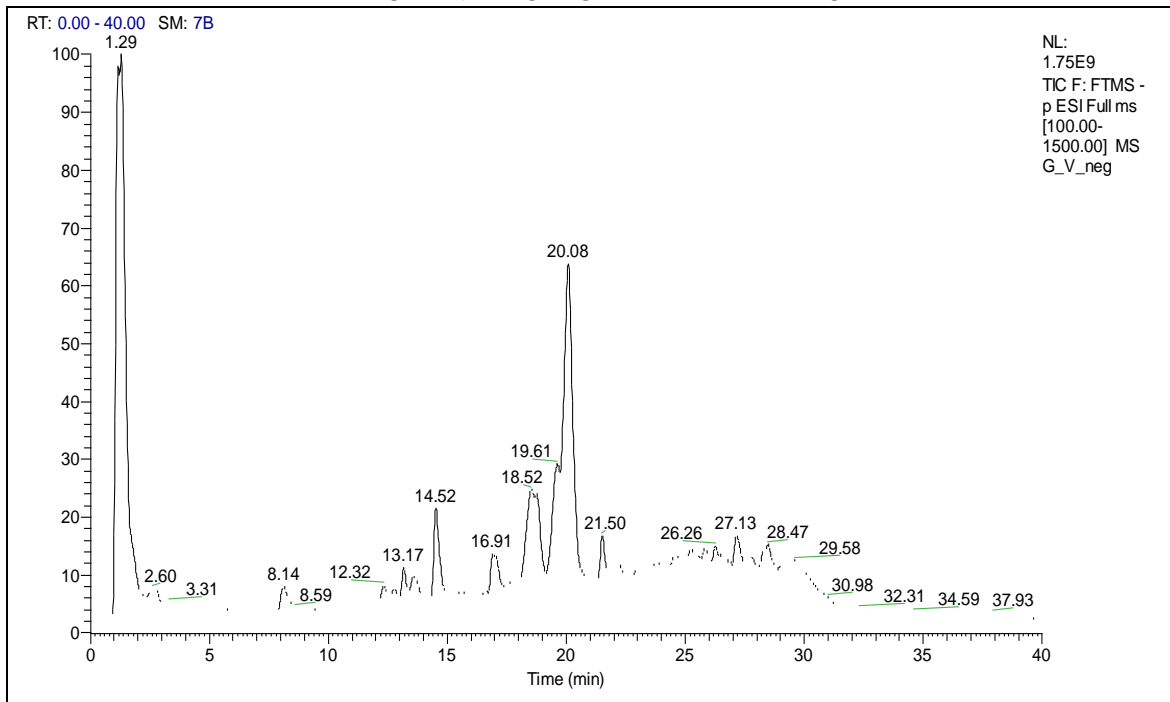
4. melléklet: Totál ion kromatogram (alkoholos articsóka extraktum, negatív ionizációs mód)



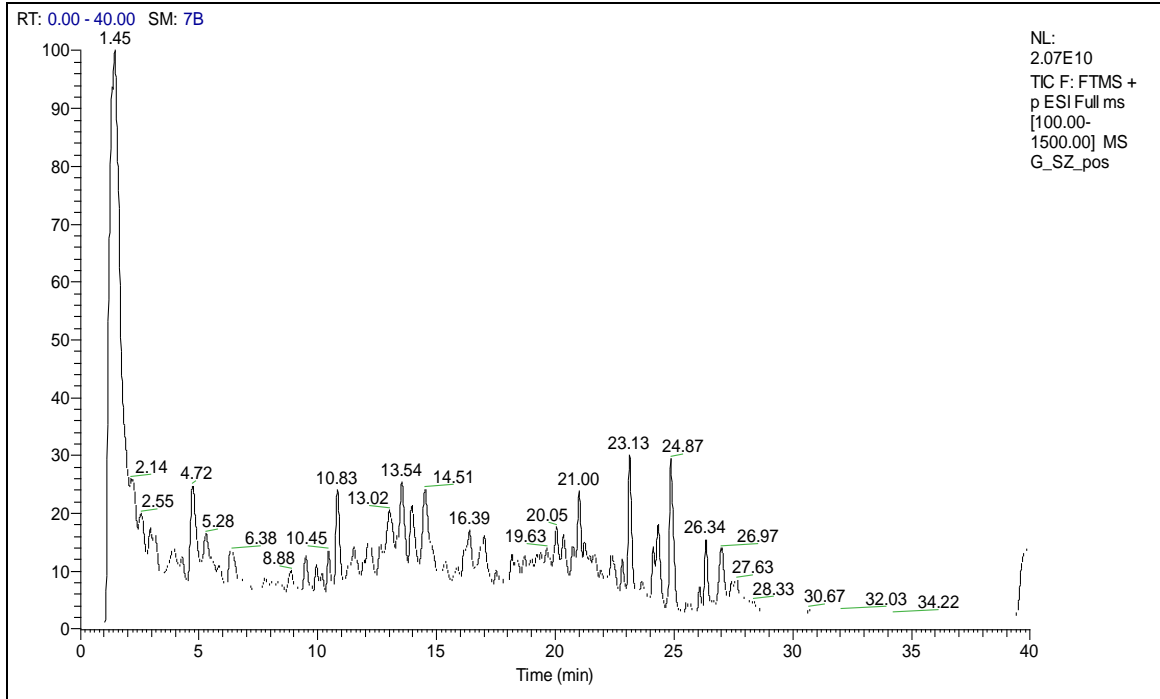
5. melléklet: Totál ion kromatogram (vizes görögszéna extraktum, pozitív ionizációs mód)



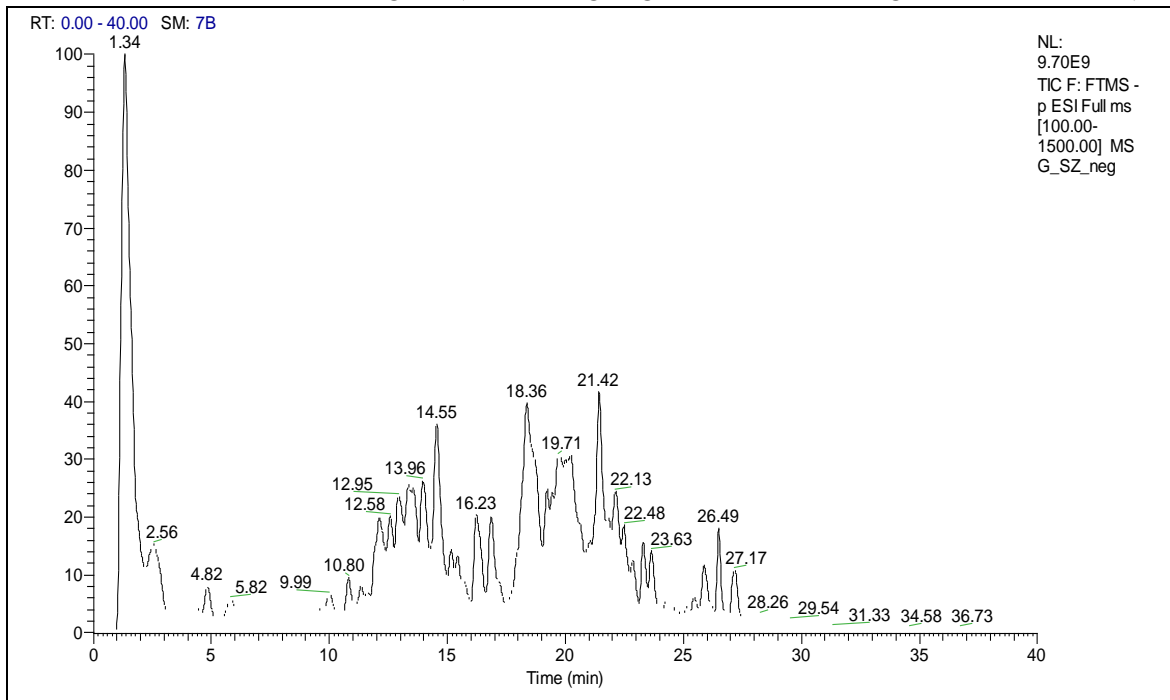
6. melléklet: Totál ion kromatogram (vizes görögszéna extraktum, negatív ionizációs mód)



7. melléklet: Totál ion kromatogram (alkoholos görögszéna extraktum, pozitív ionizációs mód)



8. melléklet: Totál ion kromatogram (alkoholos görögszéna extraktum, negatív ionizációs mód)



9. melléklet: UHPLC-ESI-MS találatok (Vizes articsóka); * [M]⁺; ** Sztenderddel megerősítve

Sor-szám	R _t	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	Összegképlet	Talált fragmensek	Vegyület neve
1	1.22	104.10754*		C ₅ H ₁₄ NO	60.0814, 59.0736, 58.0657	Choline
2	1.27	175.11951		C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	158.0922, 130.0975, 116.0707, 112.0871, 70.0656, 60.0563	Arginine**
3	1.27		179.05557	C ₆ H ₁₂ O ₆	113.0229, 101.0229, 89.0228, 85.0279, 71.0122	Glucose or galactose
4	1.29	138.05550*		C ₇ H ₈ NO ₂	110.0602, 96.0447, 94.0655, 92.0498, 65.0391	Trigonelline
5	1.32	133.06132		C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	116.0344, 88.0397, 87.0557, 74.0242, 70.0292	Asparagine**
6	1.43	324.05968		C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	112.0507, 95.0240	Cytidine**
7	1.48	146.09296		C ₅ H ₁₁ N ₃ O ₂	128.0817, 111.0555, 104.0709, 87.0444, 86.0605, 60.0563	4-Guanidinobutyric acid
8	1.51	136.06233		C ₅ H ₅ N ₅	119.0352, 94.0402, 92.0246, 67.0296	Adenine
9	1.52		362.05018	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₈ P	211.0005, 150.0408, 133.0142, 96.9681, 78.9574	Guanosine 5'- monophosphate
10	1.53	168.06607		C ₈ H ₉ NO ₃	150.0548, 140.0705, 122.0600, 106.0654, 94.0655, 67.0552	Pyridoxal**
11	1.57	124.03986		C ₆ H ₅ NO ₂	96.0448, 80.0499, 78.0344	Nicotinic acid**
12	1.59	144.10245*		C ₇ H ₁₄ NO ₂	102.0554, 98.0968, 84.0812, 72.0814, 58.0658	Stachydrine
13	1.71	170.08172		C ₈ H ₁₁ NO ₃	152.0704, 134.0600, 124.0757, 96.0814	Pyridoxine**
14	1.74		243.06171	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	200.0557, 153.0291, 152.0340, 110.0232, 82.0282	Uridine
15	1.76	113.03511		C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	96.0084, 95.0245, 70.0293	Uracil**
16	1.78	182.08172		C ₉ H ₁₁ NO ₃	165.0544, 147.0439, 136.0756, 123.0440, 119.0492, 91.0545	2-Hydroxyphenyl- alanine

17	1.92	123.05584		C ₆ H ₆ N ₂ O	106.0291, 96.0447, 80.0500	Nicotinamide**
18	2.34		346.05526	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	211.0006, 192.9902, 134.0459, 96.9681, 78.9574	Adenosine 5'- monophosphate
19	2.62		282.08385	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	150.0408, 133.0143, 126.0295, 108.0188, 107.0348	Guanosine
20	2.94	268.10458		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	136.0617, 119.0350, 69.0341, 57.0342	Adenosine**
21	3.18	166.08681		C ₉ H ₁₁ NO ₂	149.0602, 131.0492, 120.0808, 107.0495, 103.0546, 93.0701	Phenylalanine**
22	3.27		353.08726	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.0552, 179.0342, 135.0437	Caffeoylquinic acid I
23	4,78	122.09698		C ₈ H ₁₁ NO ₂	105.0702, 103.0546, 79.0549	Phenethylamine
24	4.83	220.11850		C ₉ H ₁₇ NO ₅	202.1073, 184.0967, 174.1122, 116.0343, 90.0553, 72.0449	Pantothenic acid**
25	5.90		337.09234	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	191.0552, 163.0388, 93.0329	Coumaroylquinic acid I
26	6.52	205.09771		C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	188.0705, 170.0599, 159.0915, 146.0599, 132.0809, 118.0652	Tryptophan**
27	7.66		353.08726	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.0552, 179.0338, 135.0438	Caffeoylquinic acid II
28	8.31	190.05042		C ₁₀ H ₇ NO ₃	162.0547, 144.0442, 116.0496, 89.0390	Kynurenic acid
29	8.84	341.08726		C ₁₅ H ₁₆ O ₉	179.0338, 151.0388, 133.0285, 123.0442, 85.0288	Esculin
30	8.86		335.07669	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	179.0339, 161.0231, 135.0438, 111.0436	Caffeoylshikimic acid I
31	9.57	295.12940		C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	278.1119, 232.0961, 186.0916, 166.0861, 120.0808	γ-Glutamylphenyl- alanine
32	9.97	298.09739		C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃ S	163.0422, 145.0313, 136.0617, 97.0288, 75.0269, 61.0113	5'-S-Methyl-5'- thioadenosine
33	10.1 9		337.09234	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	191.0552, 163.0389, 93.0329	Coumaroylquinic acid II
34	11.5 3	191.07082		C ₁₁ H ₁₀ O ₃	176.0466, 148.0518, 135.0807, 131.0492, 105.0701	7-Methoxy-4- methylcoumarin

35	12.7 8		593.15065	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	473.1093, 383.0772, 353.0666	Vicenin-2 (6,8-Di- C-glucosylapigenin)
36	13.0 2		335.07669	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	179.0339, 161.0232, 135.0438, 111.0438	Caffeoylshikimic acid III
37	13.0 2		515.11896	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	335.0776, 191.0552, 179.0339, 161.0232, 135.0438	1,3-Di-O- caffeoylquinic acid (Cynarin)
38	13.2 7	283.15455		C ₁₅ H ₂₂ O ₅	265.1429, 247.1324, 219.1376, 177.1272, 175.1115, 159.1166, 157.1009	Cynaratriol
39	13.5 4		461.07201	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	285.0404, 217.0501, 199.0389, 175.0390, 151.0025, 133.0274	Luteolin-7-O- glucuronide
40	13.5 4	146.06059		C ₉ H ₇ NO	118.0652, 117.0573, 91.0545, 65.0392	Indole-4- carbaldehyde
41	13.8 1	179.07082		C ₁₀ H ₁₀ O ₃	161.0594, 147.0438, 119.0492, 105.0701, 91.0545, 55.0185	4-Hydroxy-3- methoxy- cinnamaldehyde
42	14.6 0		445.07709	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	269.0454, 225.0546, 151.0024, 149.0230, 117.0330, 107.0126	Apigenin-7-O- glucuronide
43	14.7 4		593.15065	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	285.0404, 133.0275	Luteolin-7-O- rutinoside (Scolymoside)
44	14.7 9		447.09274	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	327.0509, 285.0403, 284.0326, 256.0373, 151.0023, 133.0279	Luteolin-7-O- glucoside (Cynaroside)
45	15.2 0		193.05009	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	178.0262, 149.0596, 137.0231, 134.0359, 133.0281	Ferulic acid
46	15.6 7	433.11347		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	271.0600, 153.0180, 119.0493, 91.0545	Cosmosiin (Apigenin-7-O- glucoside)**
47	17.9 8		285.03991	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	217.0499, 199.0393, 175.0389, 151.0023, 133.0281	Luteolin
48	20.3 4		809.43235	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₅	647.3814, 603.3902, 585.3796, 471.3476, 439.3206, 423.3265	Cynarasaponin E
49	21.8 6		793.43744	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	631.3859, 587.3961, 569.3844, 555.3682, 497.3637, 455.3519	Cynarasaponin C

10. melléklet: UHPLC-MS találatok (Alkoholos articsóka); * [M]⁺; ** Sztenderddel megerősítve

Sor-szám	R _t	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	Összegképlet	Talált fragmensek	Vegyület neve
1	1.26	138.05550*		C ₇ H ₈ NO ₂	110.0603, 96.0449, 94.0654, 92.0498, 65.0391	Trigonelline
2	1.28	104.10754*		C ₅ H ₁₄ NO	60.0814, 59.0736, 58.0657	Choline
3	1.30	175.11951		C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	158.0923, 130.0976, 116.0707, 112.0871, 70.0657, 60.0563	Arginine**
4	1.35	133.06132		C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	116.0343, 88.0397, 87.0557, 74.0242, 70.0293	Asparagine**
5	1.38		179.05557	C ₆ H ₁₂ O ₆	113.0229, 101.0230, 89.0228, 85.0279, 71.0122	Glucose or galactose
6	1.50	324.05968		C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	112.0507, 95.0243	Cytidine**
7	1.52	146.09296		C ₅ H ₁₁ N ₃ O ₂	128.0815, 111.0554, 104.0710, 87.0444, 86.0604, 60.0562	4-Guanidinobutyric acid
8	1.53	136.06233		C ₅ H ₅ N ₅	119.0353, 94.0403, 92.0243, 67.0300	Adenine
9	1.62	124.03986		C ₆ H ₅ NO ₂	96.0448, 80.0500, 78.0343	Nicotinic acid**
10	1.75	170.08172		C ₈ H ₁₁ NO ₃	152.0704, 134.0601, 124.0757, 96.0811	Pyridoxine**
11	1.83	113.03511		C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	96.0084, 95.0245, 70.0292	Uracil**
12	1.84	182.08172		C ₉ H ₁₁ NO ₃	165.0542, 147.0439, 136.0756, 123.0442, 119.0491, 91.0543	2-Hydroxyphenylalanine
13	1.94	123.05584		C ₆ H ₆ N ₂ O	106.0290, 96.0448, 80.0500	Nicotinamide**
14	2.68		282.08385	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	150.0408, 133.0142, 126.0294, 108.0188, 107.0348	Guanosine
15	2.99	268.10458		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	136.0617, 119.0347, 69.0340, 57.0342	Adenosine**
16	3.23	166.08681		C ₉ H ₁₁ NO ₂	149.0601, 131.0493, 120.0808, 107.0496, 103.0546, 93.0703	Phenylalanine**
17	4.85	122.09698		C ₈ H ₁₁ N	105.0702, 103.0546, 79.0549	Phenethylamine

18	4.87	220.11850		C ₉ H ₁₇ NO ₅	202.1070, 184.0967, 174.1126, 116.0343, 90.0553, 72.0449	Pantothenic acid**
19	6.54	205.09771		C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	188.0705, 170.0598, 159.0916, 146.0599, 132.0810, 118.0653	Tryptophan**
20	8.26	190.05042		C ₁₀ H ₇ NO ₃	162.0547, 144.0442, 116.0492, 89.0393	Kynurenic acid
21	8.79	341.08726		C ₁₅ H ₁₆ O ₉	179.0337, 151.0389, 133.0284, 123.0440, 85.0288	Esculin
22	9.55	295.12940		C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	278.1121, 232.0964, 186.0912, 166.0859, 120.0808	γ-Glutamylphenyl- alanine
23	9.95	298.09739		C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃ S	163.0422, 145.0318, 136.0617, 97.0288, 75.0268, 61.0113	5'-S-Methyl-5'- thioadenosine
24	11.4 9	174.11302		C ₈ H ₁₅ NO ₃	156.1010, 132.1019, 128.1070, 86.0968, 69.0704	N- Acetylisoleucine
25	11.5 1	191.07082		C ₁₁ H ₁₀ O ₃	176.0462, 148.0517, 135.0804, 131.0492, 105.0701	7-Methoxy-4- methylcoumarin
26	12.0 3	174.11302		C ₈ H ₁₅ NO ₃	156.1012, 132.1019, 128.1070, 86.0968	N-Acetyllecine
27	12.5 2		593.15065	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	473.1084, 383.0770, 353.0664	Vicenin-2 (6,8-Di- C- glucosylapigenin)
28	12.5 7		461.07201	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	285.0403, 217.0499, 199.0392, 175.0387, 151.0023, 133.0275	Luteolin-7-O- glucuronide
29	12.8 6	193.05009		C ₁₀ H ₈ O ₄	178.0258, 165.0544, 149.0596, 137.0596, 133.0284, 122.0363	Scopoletin
30	13.0 5		515.11896	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	335.0770, 191.0552, 179.0338, 161.0232, 135.0438	1,3-Di-O- caffeoylquinic acid (Cynarin)
31	13.2 4	283.15455		C ₁₅ H ₂₂ O ₅	265.1429, 247.1324, 219.1376, 177.1271, 175.1114, 159.1166, 157.1010	Cynaratriol
32	13.3 2	163.07591		C ₁₀ H ₁₀ O ₂	131.0492, 103.0545, 91.0547, 85.0288, 77.0393, 51.0237	Methyl cinnamate
33	13.3 8		581.18703	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₄	297.1768, 167.0337	Naringin dihydrochalcone

34	13.5 2	146.06059		C ₉ H ₇ NO	118.0652, 117.0572, 91.0545, 65.0392	Indole-4- carbaldehyde
35	13.6 5		445.07709	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	269.0454, 225.0550, 151.0023, 149.0232, 117.0328, 107.0122	Apigenin-7-O- glucuronide
36	13.8 0	179.07082		C ₁₀ H ₁₀ O ₃	161.0595, 147.0439, 119.0492, 105.0702, 91.0545, 55.0175	4-Hydroxy-3- methoxy- cinnamaldehyde
37	14.7 1		593.15065	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	285.0404, 133.0279	Luteolin-7-O- rutinoside (Scolymoside)
38	14.7 3		447.09274	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	327.0507, 285.0400, 284.0326, 256.0374, 151.0023, 133.0274	Luteolin-7-O- glucoside (Cynaroside)
39	15.1 9		193.05009	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	178.0259, 149.0595, 137.0230, 134.0359, 133.0281	Ferulic acid
40	15.2 2		269.04500	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	225.0550, 201.0550, 151.0023, 149.0230, 117.0330, 107.0123	Apigenin**
41	15.5 4	579.17139		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	271.0595, 153.0176, 145.0285	Isorhoifolin (Apigenin 7-O- rutinoside)
42	15.6 6	433.11347		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	271.0594, 153.0179, 119.0491, 91.0545	Cosmosiin (Apigenin-7-O- glucoside)**
43	17.8 9		285.03991	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	217.0498, 199.0391, 175.0388, 151.0023, 133.0280	Luteolin
44	18.9 4		539.04618	C ₂₅ H ₁₆ O ₁₄	269.0453, 201.0548, 151.0023, 149.0234, 117.0329, 107.0123	Unknown Apigenin derivative
45	19.0 3	301.07121		C ₁₆ H ₁₂ O ₆	286.0466, 258.0515, 153.0177	Diosmetin
46	21.7 6	329.10251		C ₁₈ H ₁₆ O ₆	314.0781, 313.0697, 299.0559, 296.0675, 285.0759, 268.0725	Salvigenin
47	25.3 8	291.23241		C ₁₉ H ₃₀ O ₂	259.2035, 241.1949, 217.1944, 199.1478, 175.1474, 93.0701	Stearidonic acid methyl ester
48	25.8 5	305.24806		C ₂₀ H ₃₂ O ₂	259.2058, 241.1939, 217.1952, 199.1479, 175.1480, 93.0702	Stearidonic acid ethyl ester
49	27.2 0	457.36818		C ₃₀ H ₄₈ O ₃	439.3553, 411.3619, 393.3502, 203.1793, 191.1794, 95.0859	Ursolic acid

50	19.4 3		809.43235	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₅	647.3806, 603.3903, 585.3795, 471.3476, 439.3212, 423.3265	Cynarasaponin E
51	21.2 0		793.43744	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	631.3851, 587.3955, 569.3844, 555.3679, 497.3631, 455.3530	Cynarasaponin C

11. melléklet: UHPLC-MS találatok száma (Vizes görögszéna); * $[M]^+$; ** Sztenderddel megerősítve

Sor-szám	R _t	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$	Összegképlet	Talált fragmensek	Vegyület neve
1	1.27	104.10754*		C ₅ H ₁₄ NO	60.0814, 59.0735, 58.0656	Choline
2	1.30	138.05550*		C ₇ H ₈ NO ₂	110.0601, 96.0450, 94.0654, 92.0499, 65.0392	Trigonelline
3	1.31	175.11951		C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	158.0922, 130.0975, 116.0707, 112.0870, 70.0656, 60.0563	Arginine**
4	1.31	148.06099		C ₅ H ₉ NO ₄	130.0863, 102.0553, 84.0448, 56.0501	Glutamic acid
5	1.31	118.08681		C ₅ H ₁₁ NO ₂	59.0736, 58.0657	Betaine
6	1.32	133.06132		C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	116.0342, 88.0397, 87.0557, 74.0242, 70.0294	Asparagine**
7	1.43	189.12392		C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	172.0961, 130.0863, 129.1024, 126.0915, 112.0759, 84.0812	N- α -Acetyl-lysine
8	1.46	148.09737		C ₆ H ₁₃ NO ₃	130.0862, 113.0598, 102.0916, 84.0811, 74.0241, 58.0657	4-Hydroxyisoleucine
9	1.49	324.05968		C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	112.0507, 95.0243	Cytidine**
10	1.51	146.09296		C ₅ H ₁₁ N ₃ O ₂	128.0821, 111.0555, 104.0709, 87.0444, 86.0605, 60.0563	4-Guanidinobutyric acid
11	1.52	130.08681		C ₆ H ₁₁ NO ₂	84.0812, 67.0548, 56.0502	Pipecolic acid
12	1.56	136.06233		C ₅ H ₅ N ₅	119.0352, 94.0406, 92.0244, 67.0298	Adenine
13	1.66		283.06786	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₆	151.0248, 108.0188	Xanthosine
14	1.73		243.06171	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	200.0558, 153.0293, 152.0339, 140.0340, 110.0232, 82.0282	Uridine
15	1.75	170.08172		C ₈ H ₁₁ NO ₃	152.0704, 134.0600, 124.0756, 96.0812	Pyridoxine**
16	1.82	182.08172		C ₉ H ₁₁ NO ₃	165.0545, 147.0439, 136.0757, 123.0441, 119.0492, 91.0546	2-Hydroxyphenyl-alanine
17	1.96	123.05584		C ₆ H ₆ N ₂ O	106.0287, 96.0447, 80.0499	Nicotinamide**

18	2.01	330.06035		$C_{10}H_{12}N_5O_6P$	232.0828, 136.0617, 119.0349, 98.9845, 97.0288	Adenosine 3',5'- cyclic monophosphate
19	2.10	277.13997		$C_{11}H_{20}N_2O_6$	259.1286, 213.1231, 195.1132, 168.1020, 130.0863, 84.0812	Saccharopine
20	2.23	385.12942		$C_{14}H_{20}N_6O_5S$	136.0618, 134.0271, 97.0288, 88.0219	S-Adenosyl- homocysteine
21	2.60	152.05724		$C_5H_5N_5O$	135.0301, 128.0455, 110.0351, 109,0517	Guanine
22	2.63		282.08385	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	150.0407, 133.0142, 126.0294, 108.0187, 107.0347	Guanosine
23	2.66		163.03952	$C_9H_8O_3$	119.0487, 93.0329	p-Coumaric acid
24	2.95	268.10458		$C_{10}H_{13}N_5O_4$	136.0617, 119.0358, 69.0340, 57.0343	Adenosine**
25	3.10	252.10967		$C_{10}H_{13}N_5O_3$	136.0618, 117.0548, 99.0444, 81.0342, 73.0290, 71.0497	2'- Deoxyadenosine
26	3.21	166.08681		$C_9H_{11}NO_2$	149.0598, 131.0493, 120.0808, 107.0492, 103.0545, 93.0703	Phenylalanine**
27	4.86	220.11850		$C_9H_{17}NO_5$	202.1073, 184.0967, 174.1123, 116.0343, 90.0553, 72.0449	Pantothenic acid**
28	6.49	205.09771		$C_{11}H_{12}N_2O_2$	188.0706, 170.0599, 159.0915, 146.0599, 132.0807, 118.0653	Tryptophan**
29	6.75	129.05517		$C_6H_8O_3$	111.0443, 101.0600, 83.0496, 57.0706, 55.0549, 53.0394	Sotolone (3- Hydroxy-4,5- dimethyl- 2(5H)furanone)
30	8.31	190.05042		$C_{10}H_7NO_3$	162.0547, 144.0435, 116.0493, 89.0388	Kynurenic acid
31	9.53	295.12940		$C_{14}H_{18}N_2O_5$	278.1017, 232.0965, 186.0912, 166.0860, 120.0808	γ - Glutamylphenylal anine
32	11.5 6	186.11302		$C_9H_{15}NO_3$	168.1017, 150.0909, 124.1121, 100.0760, 93.0703, 82.0656	Ecgonine
33	12.3 2		593.15065	$C_{27}H_{30}O_{15}$	503.1202, 473.1087, 383.0771, 353.0665	Vicenin-2 (6,8-Di- C- glucosylapigenin)
34	12.7 5		593.15065	$C_{27}H_{30}O_{15}$	503.1215, 473.1088, 383.0772, 353.0666	Apigenin-di-C- hexoside (Vicenin-2- isomer)

35	13.1 7		563.14009	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	503.1187, 473.1091, 443.0977, 413.0878, 383.0772, 353.0666	Vicenin-3 (6-C- Glucosyl-8-C- xylosylapigenin)
36	13.7 4	449.10839		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	395.0760, 377.0658, 353.0642, 339.0850, 329.0651, 299.0546	Isoorientin (Homoorientin, Luteolin-6-C- glucoside)
37	13.7 5		563.14009	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	503.1194, 473.1096, 443.0982, 413.0876, 383.0772, 353.0666	Vicenin-1 (6-C- Xylosyl-8-C- glucosylapigenin)
38	13.9 0	200.12867		C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	182.1174, 100.0759, 91.0544, 82.0656	Ecgonine methyl ester
39	14.4 3		577.15574	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	503.1193, 473.1097, 413.0877, 383.0771, 353.0665, 117.0330	Apigenin-6-C- glucoside-8-C- rhamnoside
40	14.6 5	433.11348		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	379.0805, 361.0709, 349.0695, 337.0705, 313.0702, 283.0598	Isovitexin (Apigenin-6-C- glucoside)
41	18.2 5		1195.57478	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₇	705.3873, 609.3632, 447.3101	Trigofoenoside G
42	18.4 9		905.47461	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₉	773.4326, 611.3798, 449.3270	Trigoneoside Ia
43	18.6 2		1063.53252	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₃	609.3646, 447.3091	Protoyuccagenin- S4
44	18.8 3		919.49026	C ₄₅ H ₇₆ O ₁₉	773.4315, 611.3812, 449.3269	Trigoneoside Xa
45	18.8 4		905.47461	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₉	773.4336, 611.3795, 449.3268	Trigoneoside Ib
46	19.6 1		919.49026	C ₄₅ H ₇₆ O ₁₉	773.4322, 611.3808, 449.3268	Trigoneoside Xb
47	19.7 3		887.46405	C ₄₄ H ₇₂ O ₁₈	593.3680, 431.3171	Trigoneoside VIII
48	19.7 8		1225.58534	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₈	1077.2218, 901.4799, 755.4219, 593.3695, 413.3065	Trigoneoside XIIIa
49	19.8 8		889.47970	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₈	757.4387, 595.3850, 433.3320	Trigoneoside IIa
50	19.9 8		1063.53252	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₃	755.4216, 593.3688, 575.3601, 431.3159	Trigoneoside IVa
51	20.0 0		1065.54817	C ₅₁ H ₈₆ O ₂₃	757.4368, 595.3844, 433.3323	Trigofoenoside C
52	20.1 0		1047.53760	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₂	755.4216, 575.3581, 431.3166	Asparasaponin I (Protodioscin, Trigonelloside C)

53	20.3 0		901.47970	$C_{45}H_{74}O_{18}$	755.4237, 593.3704, 431.3162	Trigoneoside XIIa
54	20.3 7		903.49535	$C_{45}H_{76}O_{18}$	757.4390, 595.3836, 433.3312	Trigoneoside IIIa

12. melléklet: UHPLC-MS találatok (Alkoholos görögszéna); * [M]⁺; ** Sztenderddel megerősítve

Sor-szám	R _t	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	Összegképlet	Talált fragmensek	Vegyület neve
1	1.22	104.10754*		C ₅ H ₁₄ NO	60.0814, 59.0736, 58.0657	Choline
2	1.32	138.05550*		C ₇ H ₈ NO ₂	110.0604, 96.0447, 94.0655, 92.0497, 65.0392	Trigonelline
3	1.31	175.11951		C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	158.0923, 130.0975, 116.0707, 112.0872, 70.0657, 60.0563	Arginine**
4	1.31	148.06099		C ₅ H ₉ NO ₄	130.0863, 102.0553, 84.0448, 56.0501	Glutamic acid
5	1.31	118.08681		C ₅ H ₁₁ NO ₂	59.0736, 58.0657	Betaine
6	1.40	189.12392		C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	172.0962, 130.0862, 129.1022, 126.0913, 112.0758, 84.0811	N-α-Acetyl-lysine
7	1.42	146.09296		C ₅ H ₁₁ N ₃ O ₂	128.0810, 111.0556, 104.0709, 87.0444, 86.0604, 60.0565	4-Guanidinobutyric acid
8	1.46	130.08681		C ₆ H ₁₁ NO ₂	84.0812, 67.0547, 56.0502	Pipecolic acid
9	1.63	124.03986		C ₆ H ₅ NO ₂	96.0448, 80.0500, 78.0343	Nicotinic acid**
10	1.72		283.06786	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₆	151.0248, 108.0188	Xanthosine
11	1.73		243.06171	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	200.0556, 153.0292, 152.0341, 140.0339, 110.0233, 82.0282	Uridine
12	1.72	170.08172		C ₈ H ₁₁ NO ₃	152.0705, 134.0601, 124.0757, 96.0812	Pyridoxine**
13	1.79	182.08172		C ₉ H ₁₁ NO ₃	165.0545, 147.0440, 136.0757, 123.0441, 119.0492, 91.0547	2-Hydroxyphenyl-alanine
14	1.93	123.05584		C ₆ H ₆ N ₂ O	106.0288, 96.0448, 80.0500	Nicotinamide**
15	2.09	277.13997		C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₆	259.1282, 213.1233, 195.1130, 168.1018, 130.0863, 84.0812	Saccharopine
16	2.20	385.12942		C ₁₄ H ₂₀ N ₆ O ₅ S	136.0617, 134.0270, 97.0288, 88.0219	S-Adenosyl-homocysteine
17	2.62		282.08385	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	150.0408, 133.0142, 126.0294, 108.0187, 107.0348	Guanosine
18	2.66		163.03952	C ₉ H ₈ O ₃	119.0487, 93.0331	p-Coumaric acid

19	2.95	268.10458		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	136.0617, 119.0358, 69.0340, 57.0343	Adenosine**
20	3.10	252.10967		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₃	136.0617, 117.0547, 99.0444, 81.0341, 73.0289, 71.0497	2'- Deoxyadenosine
21	3.17	166.08681		C ₉ H ₁₁ NO ₂	149.0600, 131.0492, 120.0808, 107.0495, 103.0545, 93.0702	Phenylalanine**
22	3.37	153.04126		C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	136.0142, 110.0351, 82.0403	Xanthine
23	4.80	220.11850		C ₉ H ₁₇ NO ₅	202.1071, 184.0967, 174.1125, 116.0344, 90.0553, 72.0449	Pantothenic acid**
24	6.33	205.09771		C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	188.0705, 170.0597, 159.0915, 146.0599, 132.0808, 118.0652	Tryptophan**
25	6.75	129.05517		C ₆ H ₈ O ₃	111.0443, 101.0601, 83.0496, 57.0705, 55.0549, 53.0393	Sotolone (3- Hydroxy-4,5- dimethyl- 2(5H)furanone)
26	8.35	190.05042		C ₁₀ H ₇ NO ₃	162.0547, 144.0444, 116.0493, 89.0390	Kynurenic acid
27	9.50	295.12940		C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	278.1019, 232.0964, 186.0913, 166.0860, 120.0808	γ- Glutamylphenylal anine
28	9.94	134.04534		C ₄ H ₇ NO ₄	116.0344, 88.0397, 74.0242, 70.0737	Aspartic acid
29	9.94	298.09739		C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃ S	163.0423, 145.0318, 136.0617, 97.0287, 75.0268, 61.0113	5'-S-Methyl-5'- thioadenosine
30	10.9 2		455.09680	C ₁₇ H ₂₁ N ₄ O ₉ P	255.0886, 241.0725, 213.0159, 199.0005, 96.9681, 78.9575	Flavin mononucleotide
31	11.5 3	186.11302		C ₉ H ₁₅ NO ₃	168.1018, 150.0914, 124.1123, 93.0703, 82.0656	Ecgonine
32	11.8 1	271.06065		C ₁₅ H ₁₀ O ₅	253.0483, 243.0648, 215.0700, 153.0181, 149.0232, 91.0544	Genistein
33	12.1 0		593.15065	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	503.1193, 473.1087, 383.0772, 353.0665	Vicenin-2 (6,8-Di- C- glucosylapigenin)
34	12.5 8		593.15065	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	503.1192, 473.1088, 383.0772, 353.0666	Apigenin-di-C- hexoside (Vicenin-2- isomer)

35	12.8 1	193.05009		C ₁₀ H ₈ O ₄	178.0259, 165.0544, 149.0596, 137.0597, 133.0284, 122.0360	Scopoletin
36	13.1 0		563.14009	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	503.1177, 473.1092, 443.0977, 413.0875, 383.0771, 353.0665	Vicenin-3 (6-C- Glucosyl-8-C- xylosyl)apigenin
37	13.1 7	229.08647		C ₁₄ H ₁₂ O ₃	211.0754, 183.0804, 135.0440, 119.0492, 107.0494, 91.0546	Resveratrol
38	13.5 2	449.10839		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	395.0754, 377.0649, 353.0651, 339.0858, 329.0651, 299.0546	Isoorientin (Homoorientin, Luteolin-6-C- glucoside)
39	13.7 0		563.14009	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	503.1196, 473.1077, 443.0978, 413.0877, 383.0771, 353.0665	Vicenin-1 (6-C- Xylosyl-8-C- glucosyl)apigenin
40	13.8 2	200.12867		C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	182.1176, 100.0602, 91.0544, 82.0656	Ecgonine methyl ester
41	13.9 6	433.11348		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	415.1003, 397.0918, 379.0806, 367.0806, 313.0703, 283.0598	Vitexin (Apigenin-8-C- glucoside)
42	14.3 3		577.15574	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	503.1193, 473.1084, 413.0877, 383.0772, 353.0666, 117.0331	Apigenin-6-C- glucoside-8-C- rhamnoside
43	14.5 1	433.11348		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	379.0811, 361.0699, 349.0701, 337.0701, 313.0703, 283.0598	Isovitexin (Apigenin-6-C- glucoside)
44	14.7 7		461.10839	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	371.0772, 353.0667, 341.0664, 326.0431, 313.0719, 298.0482	Scoparin (Chrysoeriol-8-C- glucoside)
45	15.6 9	493.13461		C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	331.0806, 316.0572, 315.0493, 287.0540, 286.0451, 270.0518	Tricin-7-O- glucoside
46	16.1 8	595.14517		C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	431.0971, 413.0861, 353.0652, 329.0652, 299.0547, 147.0439	Luteolin-8-C-(2"- O-(E)-p- coumaroyl)glycosi de)
47	17.5 3		271.06065	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	227.0709, 177.0181, 165.0181, 151.0024, 119.0487, 107.0123	Naringenin
48	18.1 2		1195.57478	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₇	705.3867, 609.3640, 447.3112	Trigofenoside G
49	18.3 6		905.47461	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₉	773.4312, 611.3799, 449.3272	Trigoneoside Ia
50	18.4 9		1063.53252	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₃	609.3642, 447.3113	Protoyuccagenin- S4

51	18.7 5		919.49026	C ₄₅ H ₇₆ O ₁₉	773.4318, 611.3799, 449.3271	Trigoneoside Xa
52	18.9 1		905.47461	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₉	773.4330, 611.3799, 449.3272	Trigoneoside Ib
53	18.9 7	331.08178		C ₁₇ H ₁₄ O ₇	316.0573, 315.0494, 287.0548, 286.0449, 270.0518, 153.0173	Tricin
54	19.0 5		299.05556	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	284.0326, 256.0375, 255.0286, 227.0349, 151.0022, 107.0121	Chrysoeriol
55	19.5 7		887.46405	C ₄₄ H ₇₂ O ₁₈	593.3685, 431.3164	Trigoneoside VIII
56	19.6 1		919.49026	C ₄₅ H ₇₆ O ₁₉	773.4322, 611.3808, 449.3268	Trigoneoside Xb
57	19.6 2		1225.58534	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₈	1077.9872, 901.4840, 755.4224, 593.3697, 413.3166	Trigoneoside XIIIa
58	19.8 7		271.09704	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	243.1017, 161.0595, 147.0438, 137.0596, 123.0441, 109.0650	Medicarpin
59	19.6 7		889.47970	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₈	757.4375, 595.3850, 433.3320	Trigoneoside IIa
60	19.6 9		935.48518	C ₄₅ H ₇₆ O ₂₀	757.4380, 595.3840, 433.3319	Protoneogitogenin -S5
61	19.7 9		1063.53252	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₃	755.4224, 593.3696, 575.3585, 431.3165	Trigoneoside IVa
62	19.7 4		1065.54817	C ₅₁ H ₈₆ O ₂₃	757.4377, 595.3851, 433.3321	Trigofoenoside C
63	19.9 7		1047.53760	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₂	755.4224, 575.3589, 431.3164	Asparasaponin I (Protodioscin, Trigonelloside C)
64	20.1 9		901.47970	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₈	755.4287, 593.3687, 431.3164	Trigoneoside XIIa
65	20.2 9		903.49535	C ₄₅ H ₇₆ O ₁₈	757.4388, 595.3852, 433.3320	Trigoneoside IIIa
66	21.4 7		941.51100	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	733.4561, 615.3893, 457.3680, 205.0710, 163.0599	Soyasaponin I
67	27.2 2	457.36818		C ₃₀ H ₄₈ O ₃	411.3607, 393.3505, 203.1794, 191.1793, 95.0859	Ursolic acid

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Máthé Endrének és Dr. Kovács Bélának, hogy a doktori tanulmányaim és a disszertációm elkészítése során mindvégig támogattak.

Köszönöm munkatársaimnak, az Agrár és Molekuláris Kutató Intézet kutatóinak, Czapár Máriának, Zsvér-Vadas Zsanettnek, Dr. Cziáky Zoltánnak és Dr. Jekő Józsefnek a kutatásaim során nyújtott közreműködésüket.

Bírálóimnak, Pályiné Dr. Krekk Zsuzsannának és Dr. Borbély Györgynek külön köszönettel tartozom, amiért elvállalták dolgozatom áttekintését. Bírálatuk, szakmai ajánlásaik, észrevételeik sokat segítettek abban, hogy az értekezésem még tökéletesebb legyen.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni szüleimnek a türelmüket és támogatásukat.

NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Hankóczy Jenő Doktori Iskola keretében készítettem, a Debreceni Egyetem doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2017.

.....

Vigh Szabolcs

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy Vigh Szabolcs doktorjelölt 2013-2017 között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításunkkal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javasoljuk.

Debrecen, 2017.

.....

Dr. Máthé Endre

.....

Dr. Kovács Béla