

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Készítette:

Vigh Szabolcs
doktorjelölt

Témavezetők:

Dr. Máthé Endre
egyetemi docens

Dr. Kovács Béla
egyetemi tanár



DEBRECENI EGYETEM

Hankóczy Jenő Doktori Iskola

Debrecen, 2017

1. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLKITŰZÉSEI

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 táplálékkiegészítők 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 nagyműszeres analitikai módszerekkel (UHPLC-ESI-MS; UV-VIS spektrofotométer) történő meghatározására törekedtem, majd a beazonosított bioaktív komponensek alapján vizsgáltam az extraktumok potenciális citotoxikus és genotoxikus hatásait.

Munkám célja olyan új növényi extraktumok kifejlesztése volt, amelyek potenciálisan antitumor hatással rendelkeznek.

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 hatóanyagtartalma alapján?
4. Milyen összpolicifenol-, összflavonoid-, összantocianin-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* (ecetmuslica) életképességét, illetve van-e bizonyítható citotoxikus és 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?

2. A KUTATÁS MÓDSZEREI

2.1. 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, majd centrifugálás (10 perc, 4000 rpm) után redős szűrőn átszűrtem. Az alkoholos kivonat készítésekkor a szárított articsóka levelet kétszer négy órán át rázógépen rázattam 40 °C-os hőmérsékleten. (10 g + 500 ml 50 %-os etanol (Sigma Aldrich), míg a görögszéna esetében az alkoholos extrahálás során 5 g őrölt magot 100 ml 80 %-os etanollal refluxoltam három órán át. Az oldatokat szobahőmérsékletűre hagytam lehűlni, lecentrifugáltam, 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.

2.2. Növényi extraktumok spektrofotometriai vizsgálata

2.2.1. Összpolifenol-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 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.

2.2.2. 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. 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 az abszorbancia értékét. Az eredményeket a kalibrációs egyenesből rutin-egyenértékben adtam meg.

2.2.3. Összantocianin-tartalom meghatározás

Az extraktumok antocianin-tartalmát pH-differenciális módszerrel határoztam meg (Lee *et al.*, 2005). Minden minta abszorbanciáját 520 nm és 700 nm hullámhossz tartományban is megmértem. Az antocianin-tartalmat cianidin-3-glükozidra számítottam és az eredményt mg/l dimenzióban kaptam meg. 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 µm-es szűrőn átszűrtem. A mérést 520 nm és 700 nm hullámhossz tartományban végeztem.

2.2.4. 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. A spektrofotometriás méréskor 0,2 ml extraktumhoz (vak, standard) 0,3 ml metanolt és 2,4 ml DPPH oldatot (22,6 µg/ml koncentrációban) pipettáztam. Ezt követően a mintákat 30 percig sötétben szobahőmérsékleten inkubáltam, majd mérés előtt 0,45 µm-es szűrőn átszűrtem.

2.3. Növényi extraktumok UHPLC-ESI-MS vizsgálata

Méréseim során a folyadékkromatográfiás vizsgálatokhoz Dionex Ultimate 3000RS készüléket használtam, Thermo Accucore C18 oszloppal (kolonnával) felszerelve (100/2,1 X 2,6 µm), mely egy fűthető elektropray ionizációs (HESI) rendszerrel ellátott Thermo Q Exactive 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 µl/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 µl-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.

2.4. *Drosophila melanogaster* specifikus vizsgálati módszerek

2.4.1. *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 1L-enként 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. Amint a lárvák elérték a harmadik stádiumot, a fiolákba 1ml extraktumot tettem, majd figyeltem, miként folytatódik az egyedfejlődés.

2.4.2. *Drosophila melanogaster* életképességi vizsgálatok

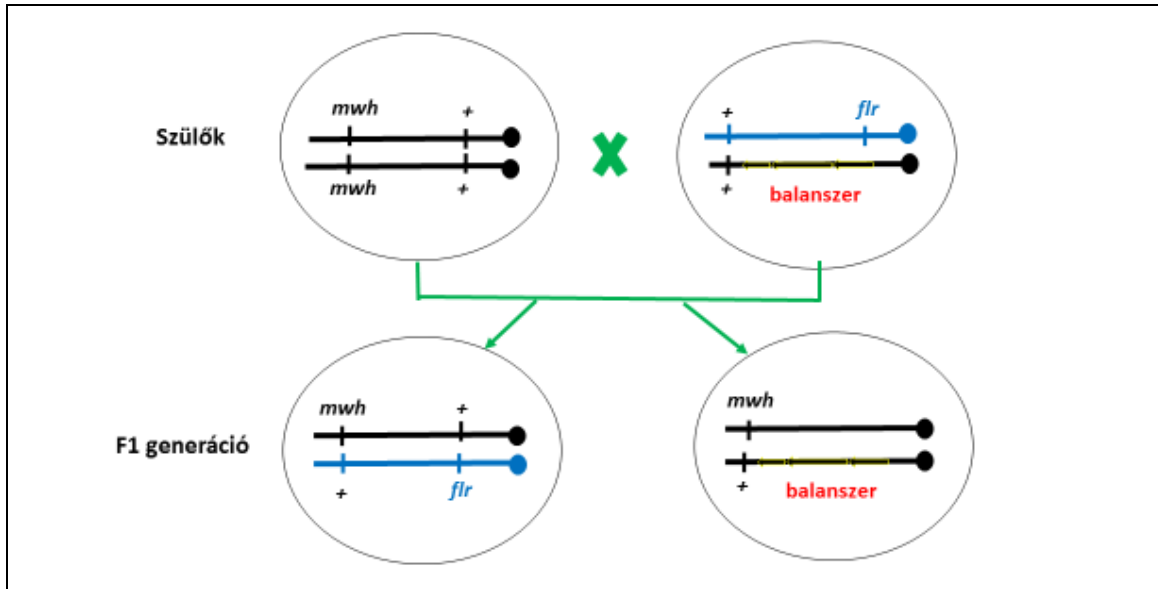
Annak érdekében, hogy megtermékenyített petéket gyűjtsék, 50 nőstény és 50 hím ecetmuslica egyedet kereszteztem össze petéztető csöveket használva. A szülőket 25°C-on, 16 óráig hagytam petézni, ezt követően lecseréltem a petéztető táptalajt. A petéztető táptalajt 4 órás időközönként cseréltem, ezekről 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 inkubátorba tettem, majd a harmadik napon (96 órás lárva állapot) a fiolákba beletettem 1ml-t a vizsgált extraktumokból, 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.

2.4.3. SMART módszer

Újonnan kikelt *mwh/mwh* nőstényeket kereszteztem *flr³/In (3LR) TM2, Ubx* hímekkel. Petéket gyűjtöttem ezektől a szülőktől a petéztető csövek és a táptalaj felhasználásával, amint azt a fentiekben írtam. A begyűjtött petékből mintaként 50 darabot normális táptalajt tartalmazó fiolára helyeztem, majd a fiolákat 25°C-os inkubátorba tettem. Három nappal később a 72±4 órás és III. stádiumos lárvákat *Drosophila* Instant Medium (Carolina Biological Supply, Burlington, NC, USA) típusú táptalajt és 1ml 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 (1. ábra).

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



1. 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.

A mikroszkópi preparátumok elkészítéséhez kivettem a rögzítő oldatból az imágókat, a szárnyaikat eltávolítottam egy csipesszel, ráhelyeztem a tárgylemezen lévő Faure oldat (30 g gumi arábicum, 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 mikroszkópi preparátumok mikroszkópi vizsgálatát először kisebb, majd nagyobb nagyítást használva, miközben *mwh/mwh* és *flr³/flr³* magányos vagy iker sejtklónokat kerestem az egyes szárnyakon. A mikroszkópi preparátumok kiértékeléséhez az Olympus CELL-R rendszert használtam.

A magányos és iker sejtklónok gyakoriságát összevetettem a kontrollként alkalmazott, normál táptalajon fejlődött egyedek, illetve a növényi extraktummal kezelt egyedek gyakoriságával.

2.5. Humán sejtvonalak tenyésztése és vizsgálata

2.5.1. Az alkalmazott humán emlőrák sejtvonalak

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

2.5.2. Sejttenyésztési körülmények

A fentiekben említett humán emlőkarcinoma sejtvonalatokat 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% 1mM-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.

2.5.3. MTT viabilitás/proliferációs teszt

96 lyukú wellplate-be 10 ezer sejtet pipettáztam well-enként, RPMI-1640 tápoldatba. Egy napot hagytam a sejteket letapadni, majd a tápoldatot az általam készített kivonatok különböző koncentrációjú (10-0,31 v/v%) oldataira cseréltem és hagytam a sejteken 48- illetve 72 óráig. Minden kísérlet alkalmával hagytam egy kezeltlen kontroll csoportot. A kezelést követően a wellről 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 már említett sejttenyésztési körülmények között. A sárga színű MTT oldat az élő sejtek mitokondriumában redukálódik bordó színű formazán kristállyá, melyet wellenként 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) trituráltam és egy plate-reader (BioTek EL808) segítségével 540 nm hullámhosszon megmértem az abszorbancia értéket, melynek értéke egyenes arányban van az élő sejtek számával (Mosmann, 1983).

2.5.4. Immunfestés

Az immunfestések során a centroszómákra (egér monoklonális Anti-humán Polokínáz 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 nevű fluoreszcens festékek voltak. A kromoszómák DNS-ét DAPI-val festettem.

Az eredményeim értékeléséhez az Olympus CELL-R mikroszkópi 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 immunfestése során egy 16 lépésből álló eljárást alkalmaztam (Máthé *et al.*, 2004; Lemos *et al.*, 2000).

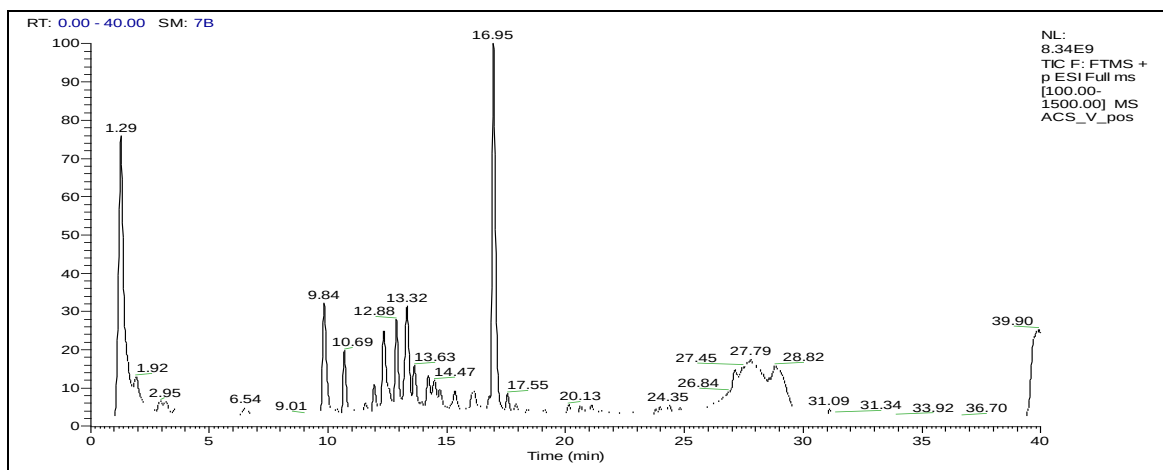
2.6. Adatfeldolgozás és kiértékelés

A mérési adatok rendszerezését és elsődleges feldolgozását a Microsoft Office Excel 2007-es programmal 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.

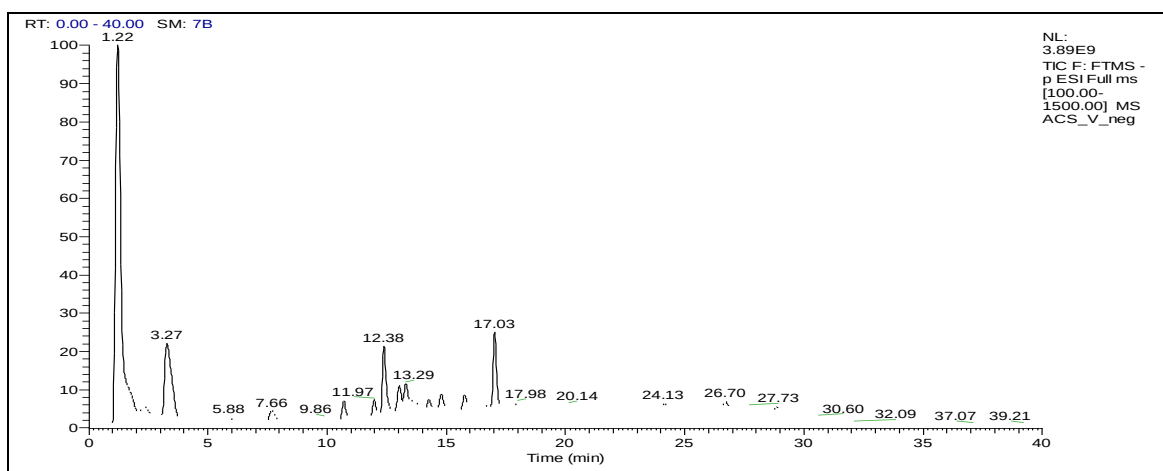
3. AZ ÉRTEKEZÉS FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSI (EREDMÉNYEI)

3.1. Articsóka és görögszéna extraktumok bioaktív hatóanyag-tartalmának UHPLC-ESI-MS jellemzése

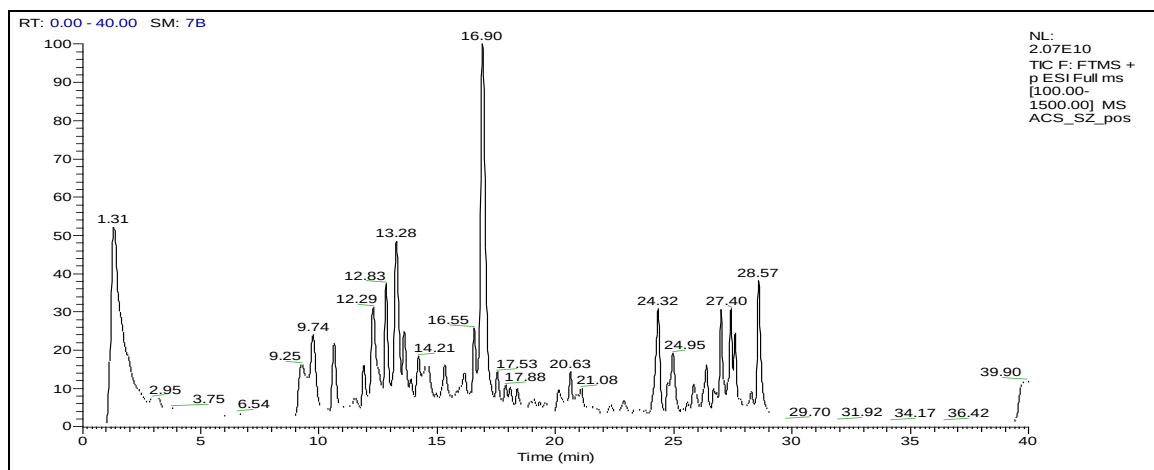
Az articsóka és görögszéna extraktumaim UHPLC-ESI-MS vizsgálata során kiderült, hogy bioaktív hatóanyag-tartalmukat tekintve hasonlóságok és különbségek is fellelhetők. Az 1. táblázatban számszerűsítve láthatók a különböző kivonataimból nagyfokú biztonsággal (totál ion kromatogram (2-9. ábra), molekulatömeg, fragmentáció és izotóp eloszlás alapján) beazonosított bioaktív hatóanyagok az egyes vegyületcsoportokon belül.



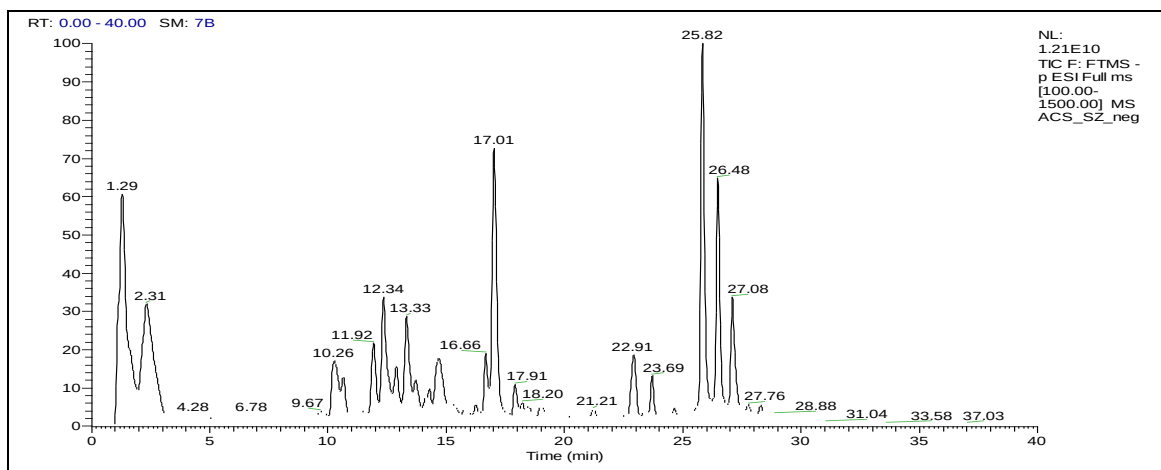
2. ábra: Totál ion kromatogram (vizes articsóka extraktum, pozitív ionizációs mód)



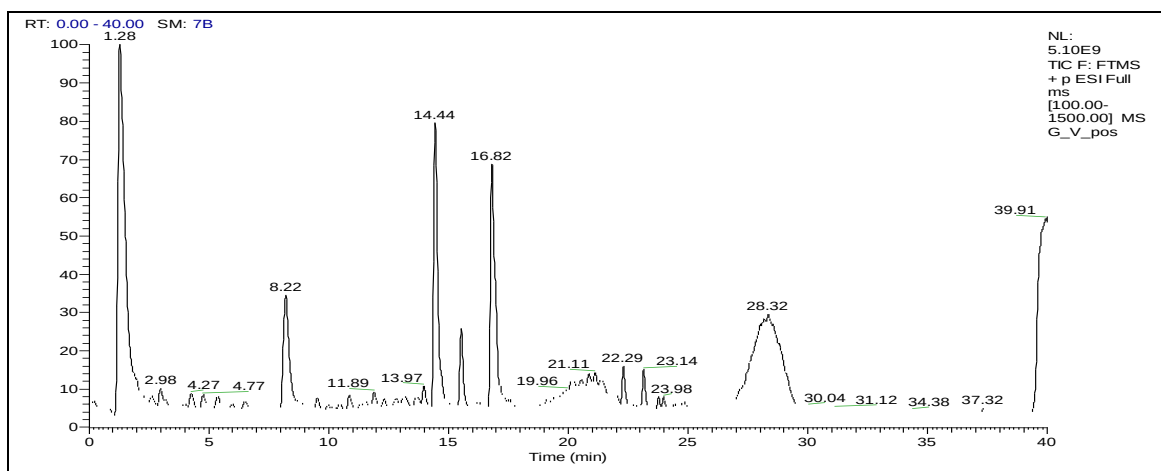
3. ábra: Totál ion kromatogram (vizes articsóka extraktum, negatív ionizációs mód)



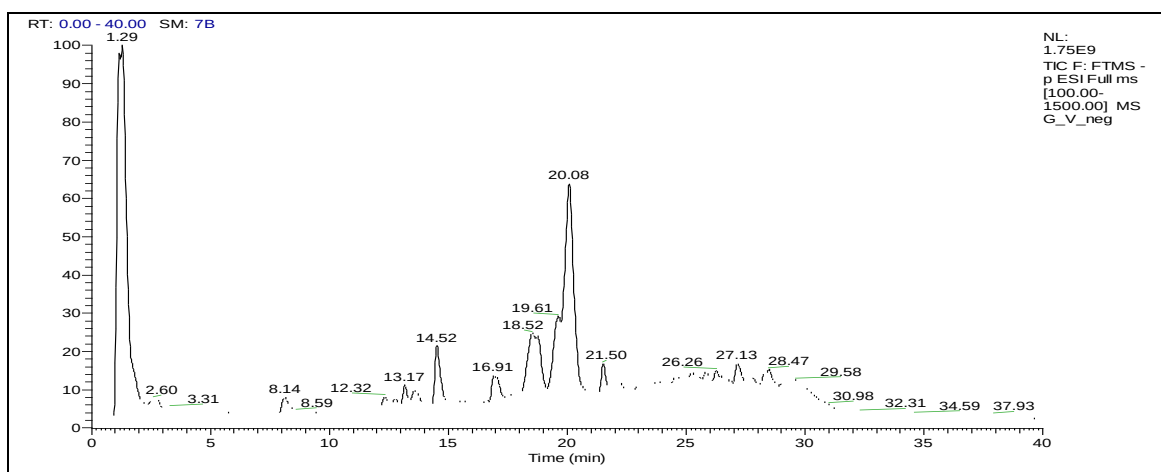
4. ábra: Totál ion kromatogram (alkoholos articsóka extraktum, pozitív ionizációs mód)



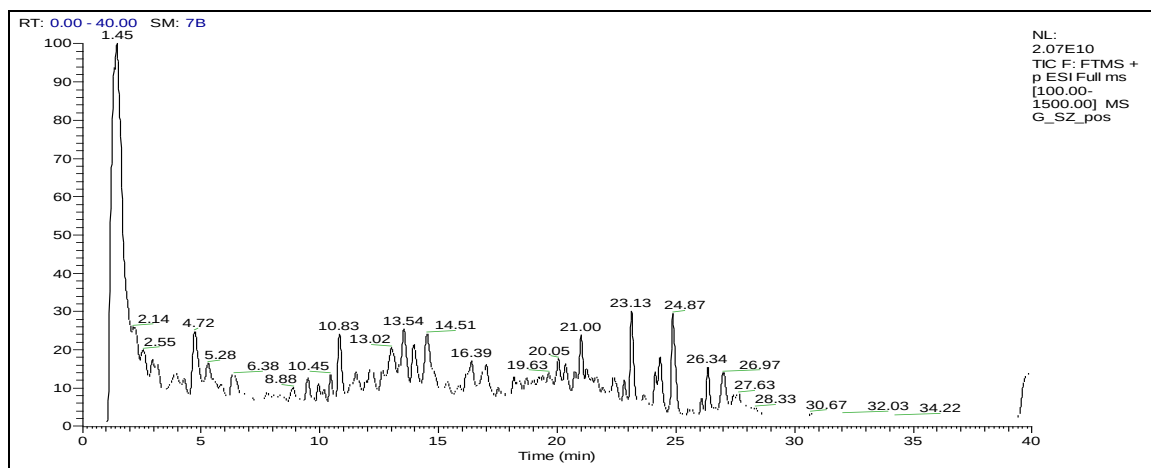
5. ábra: Totál ion kromatogram (alkoholos articsóka extraktum, negatív ionizációs mód)



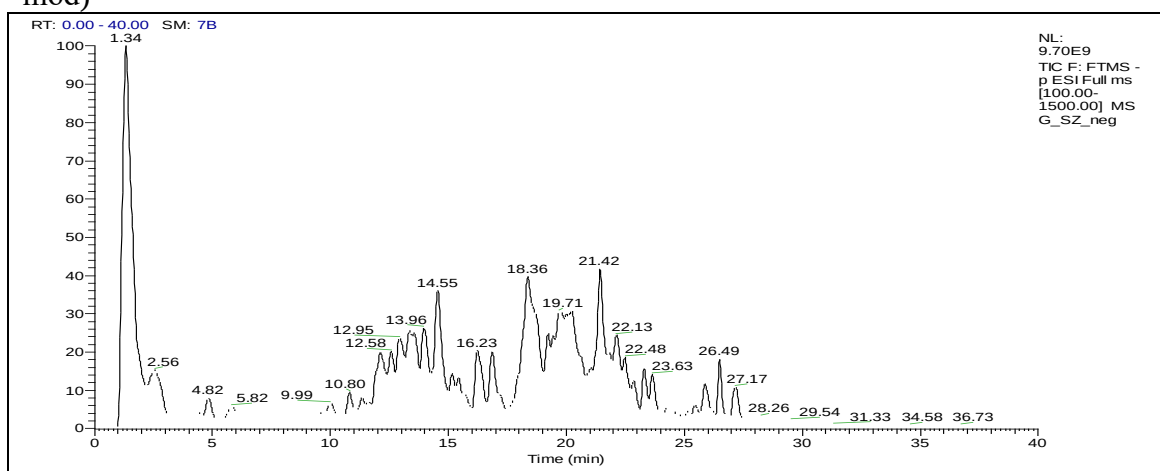
6. ábra: Totál ion kromatogram (vizes görögszéna extraktum, pozitív ionizációs mód)



7. ábra: Totál ion kromatogram (vizes görögszéna extraktum, negatív ionizációs mód)



8. ábra: Totál ion kromatogram (alkoholos görögszéna extraktum, pozitív ionizációs mód)



9. ábra: Totál ion kromatogram (alkoholos görögszéna extraktum, negatív ionizációs mód)

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

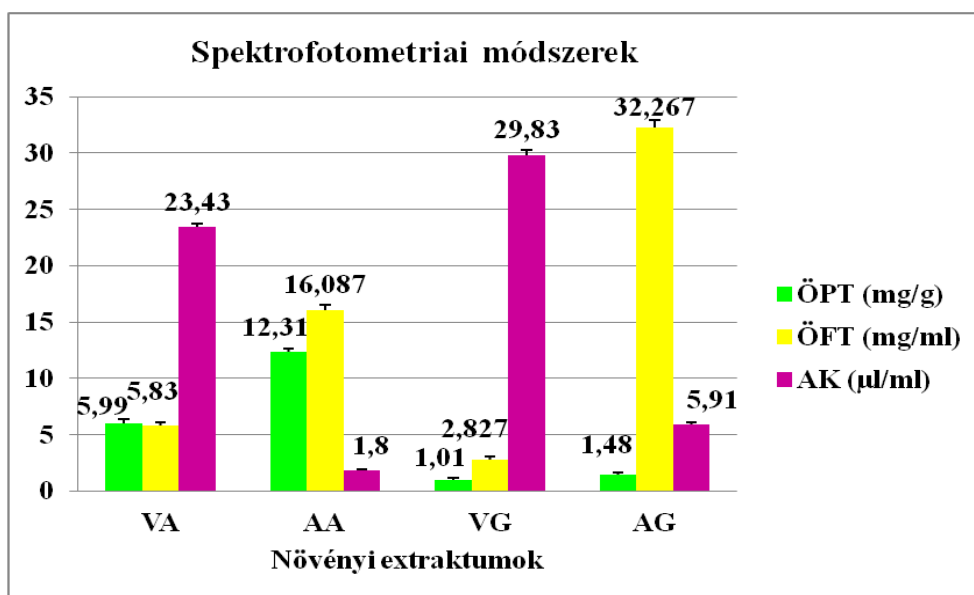
Adatbázis találatok	Vizes articsóka	Alkoholos articsóka	Vizes görögszéna	Alkoholos görögszéna
Alkaloidok	3	2	4	4
Aminosavak	7	9	12	11
Kumarinok	2	3	-	1
Flavonoidok	7	13	7	16
Egyéb metabolitok	3	4	3	3
Polifenolok	9	3	1	2
Purinok és pirimidinek	9	6	10	9
Szaponinok	2	2	14	16
Terpenoidok	1	2	-	1
Szteroidok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

Fontos kiemelni, hogy a vizes és alkoholos extraktumok előállítása, 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 beazonosítani 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 relatív sokkal kisebb számú szaponin-szerű molekula található, mint a görögszéna kivonatokban.

3.2. Articsóka és görögszéna extraktumok bioaktív hatóanyag-tartalmának és *in vitro* antioxidáns paramétereinek összehasonlító jellemzése



10. ábra: Spektrofotometriai módszerek: ahol, (VA) vizes articsóka; (AA) alkoholos articsóka; (VG) vizes görögszéna; (AG) alkoholos görögszéna; (AK) antioxidáns kapacitás; (ÖFT) összflavonoid-tartalom; (ÖPT) összpolicifenol-tartalom.

Az összpolidifenol tartalmat illetően az articsóka extraktumokban sokkal nagyobb mennyiségű polifenol található, mint a görögszénaiban. Másfelől mind az articsóka, mind a görögszéna esetében az alkoholos extraktumokban volt nagyobb a polifenolok mennyisége (10. ábra).

Ugyanezek a tendenciák állapíthatók meg az összflavonoid tartalomra vonatkozóan is. Amennyiben igaz az a feltevés, hogy az összpolidifenol és összflavonoid tartalmak egyenesen arányosak a kérdéses extraktumok *in vitro* körülmények között mért antioxidáns kapacitásával, úgy ez utóbbinak is követnie kell az összpolidifenolra 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 összpolidifenol és összflavonoid tartalom alacsonyabb a vizes articsóka és görögszéna kivonatokban, mégis az *in vitro* antioxidáns kapacitás mutat magasabb értékeket ezekben a kivonatokban.

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 beazonosítani (10. ábra).

3.3. Articsóka és görögszéna extraktumok hatásainak *in vivo* tesztelése *Drosophila melanogaster*-en

3.3.1. Articsóka és görögszéna extraktumok hatása az *ecetmuslica* életképességére

Az 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, mint amilyenket majd a genotoxicitási vizsgálatban is használni fogok. Ezzel a kísérleti megoldással külön kívántam választani az articsóka- és görögszéna extraktumok feltételezett citotoxikus és genotoxikus hatásainak *in vivo* vizsgálatát (2. táblázat). A kétféle keresztezéssel és növényi extraktumokkal kapott eredményeket a 2.-3. táblázatokban mutatom be.

2. táblázat: 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 (%)
♀ ^{w^{m4h}} x ♂ ^{w^{m4h}}	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	95,1
	Alkoholos articsóka 1:100 hígítás	1000	968	936	93,4	
♀ ^{mwh/mwh} x ♂ ^{flr³/TM2, Ubx}	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	94,5
	Alkoholos articsóka 1:100 hígítás	1000	968	945	94,5	

3. táblázat: Görögszéna extraktum *ecetmuslica* életképességet befolyásoló hatása. Kontroll kísérletek adatait sárgával, vizes extraktumra vonatkozó adatokat zölddel és 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 (%)
♀ <i>w^{m4h}</i> x ♂ <i>w^{m4h}</i>	Kontroll NM	1000	968	956	95,6	94,5
	Kontroll DIM	1000	972	944	94,4	
	Vizes görögszéna törzsoldat	1000	946	938	93,8	
	Vizes görögszéna 1:10 hígítás	1000	953	942	94,2	93,3
	Vizes görögszéna 1:100 hígítás	1000	972	957	95,7	
	Alkoholos görögszéna törzsoldat	1000	948	926	92,6	
	Alkoholos görögszéna 1:10 hígítás	1000	966	947	9,7	
	Alkoholos görögszéna 1:100 hígítás	1000	952	928	92,8	
♀ <i>mwh/mwh</i> x ♂ <i>flr³/TM2, Ubx</i>	Kontroll NM	1000	938	912	91,2	92,6
	Kontroll DIM	1000	942	921	92,1	
	Vizes görögszéna törzsoldat	1000	947	922	92,2	
	Vizes görögszéna 1:10 hígítás	1000	966	941	94,1	91,9
	Vizes görögszéna 1:100 hígítás	1000	933	916	91,6	
	Alkoholos görögszéna törzsoldat	1000	955	932	93,2	
	Alkoholos görögszéna 1:10 hígítás	1000	934	917	91,7	
	Alkoholos görögszéna 1:100 hígítás	1000	943	921	92,1	

A 2. táblázatban feltüntetett adatokból kiderül, hogy a vizes és alkoholos articsóka kivonatok – úgy tömény mint hígított formában – nem befolyásolják a kétféle keresztezésből származó F1 utodok életképességét, azaz nincs *Drosophila melanogaster*-en detektálható citotoxikus hatásuk.

A 3. táblázatban feltüntetett adatokból kiderül, hogy a vizes és alkoholos görögszéna kivonatok – úgy tömény mint hígított formában – nem befolyásolják a kétféle keresztezésből származó F1 utodok életképességét, azaz nincs *Drosophila melanogaster*-en detektálható citotoxikus hatásuk.

Tekintettel arra, hogy a toxicitási vizsgálatok során úgy a tömény mint a hígított extraktumok nem befolyásolták az *ecetmuslica* életképességét, az a döntés született, hogy a genotoxicitási vizsgálatokat elsőként a hígítatlan vizes- és alkoholos extraktumokkal fogom elvégezni újfent egy *in vivo* tesztrendszer alkalmazva.

Valójában az ♀ *mwh/mwh* x ♂ *flr³/TM2, Ubx* keresztezésből származó F1 lárvákat 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 (4. táblázat).

4. táblázat: Mozaik sejtklónok indukciójának gyakorisága az *mwh, +/+*, *flr* *ecetmuslica* szárnyain. Kontroll kísérletek adatait sárgával, az articsóka adatait zölddel, míg a görögszéna adatait barna színnel emeltem ki.

Kezelés	Szárny (N)	Mozaik sejtklón				Mozaik sejtklón gyakori- ság (n/N)	Mozaik sejtklón mérete sejt/klón (m)	Mozaik sejtklón indukció gyakorisága (f=nm/NC)
		iker	magányos		összes (n)			
			mwh	flr				
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 görög- széna	135	5	53	3	61	0,49	1,6±0,4	2,4 x 10 ⁻⁵
Alkoholos görög- széna	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 sem 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 (5. táblázat).

5. táblázat: 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.

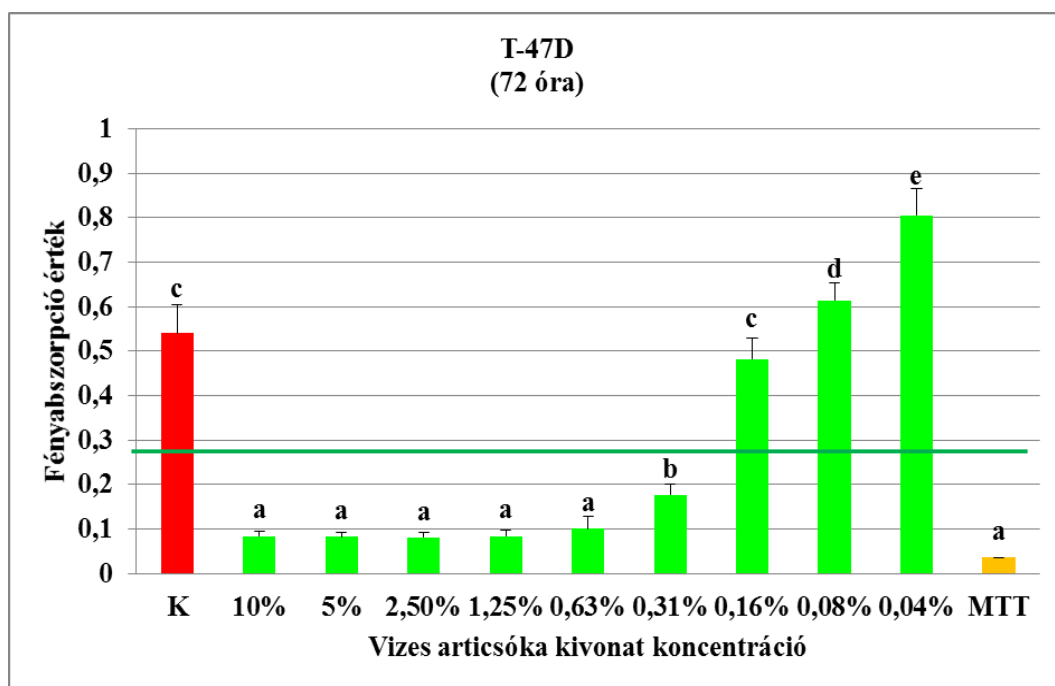
Kezelés	Szárny (N)	<i>mwh</i> mozaik sejtklón (n)	Mozaik sejtklón gyakoriság (n/N)	Mozaik sejtklón mérete sejt/klón (m)	Mozaik sejtklón indukció gyakorisága (f=2nm/NC)
Kontroll	106	11	0,1	2,4 ± 1,6	1,6 x 10 ⁻⁵
Vizes articsóka	114	12	0,1	2,2 ± 1,2	1,5 x 10 ⁻⁵
Alkoholos articsóka	102	11	0,1	2,4 ± 1,4	1,7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

3.4. Articsóka és görögszéna extraktumok *in vitro* tesztelése humán emlőkarcinóma sejtvonalakon

A T-47D és a ZR-75-1 humán emlőkarcinóma sejteket kezeltem 48 és 72 órán át különböző koncentrációjú vizes és alkoholos articsóka-, illetve görögszéna extraktummal, majd a kezelést követően elvégzett MTT teszt során mért abszorbancia

érték alapján következtettem a kezelést túlélő sejtek számára. Téziseim között jelen esetben csak a 72 órás kezelések eredményeit ismertetem (11.-16. ábra; 18.-20. 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.

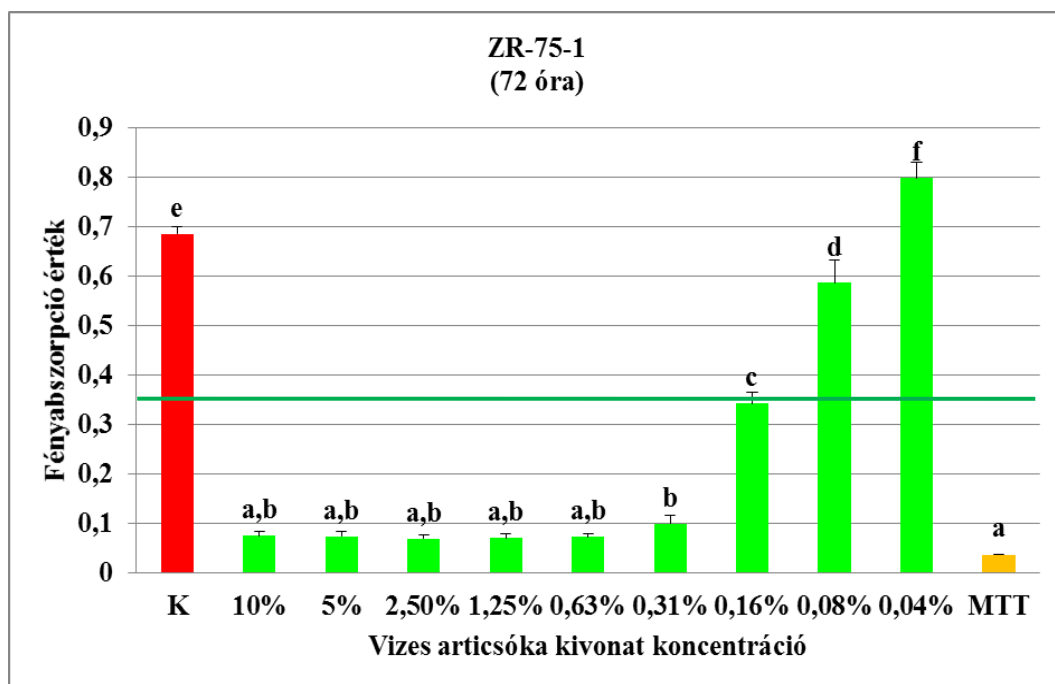


11. ábra: A vizes articsóka kivonat hatása a T-47D emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 72 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

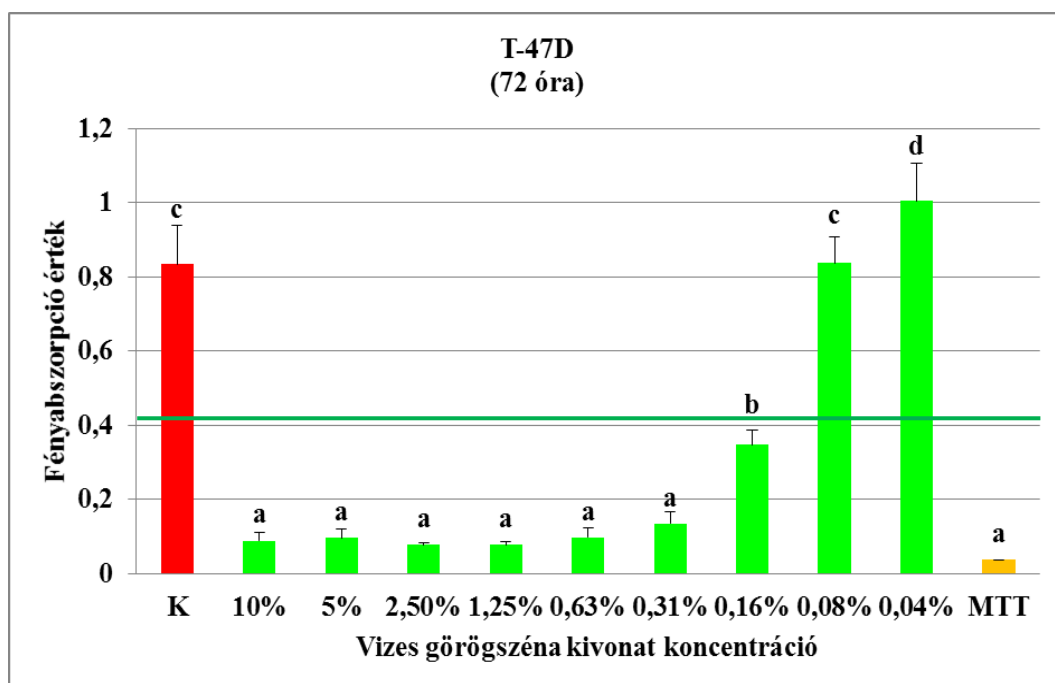
A T-47D sejtvonalon történt vizes articsóka kivonat különböző koncentrációjú 72 órás alkalmazása során kitűnik, hogy a 10-0,63% koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása jelentősen lecsökken. Azonban a 0,16-0,04%-os koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása elkezd növekedni, és a 0,08-0,04% extraktum koncentrációk a kontrollt meghaladó mértékben növelik meg a kezelt sejtek életképességét, ami akár sejtszámbeli növekedést is jelenthet. A fentiekben leírt kezelési profil mindenképpen a koncentráció-függő bifázisos élettani hatásra emlékeztet (11. ábra).

A ZR-75-1 sejtvonalon a vizes articsóka kivonat különböző koncentrációjú 72 órás alkalmazásakor szintén bifázisos élettani hatást észleltem. A 0,16-0,04% koncentrációnál detektálható a kezelt sejtek számának a növekedése és 0,04%

extraktumban haladja meg a sejtek viabilitása a kontrollét. Ez utóbbinak újfent a sejtszámnövekedés lehet az alapja (12. ábra).

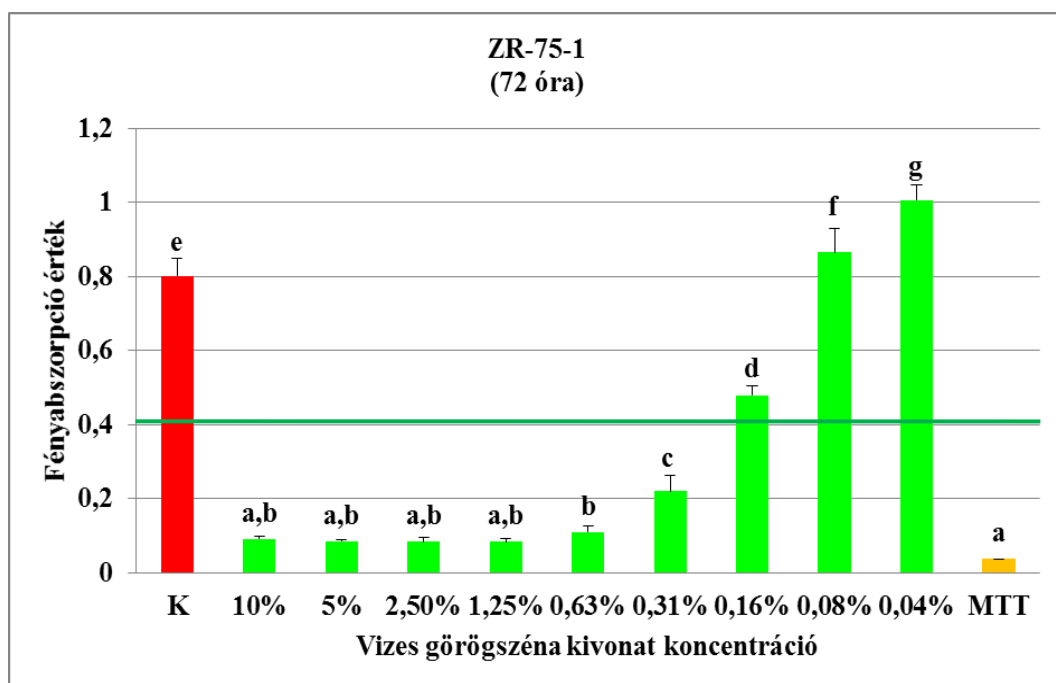


12. ábra: A vizes articsóka kivonat hatása a ZR-75-1 emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 72 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.



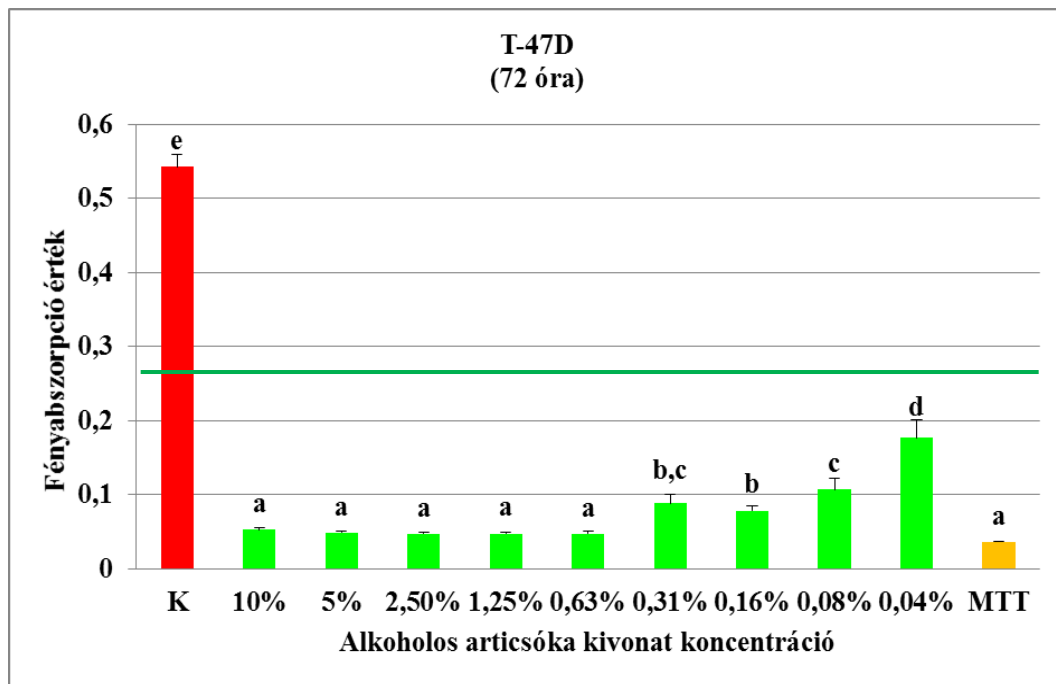
13. ábra: A vizes görögszéna kivonat hatása a T-47D emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 72 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

A T-47-D humán emlőkarcinóma sejteket kezeltem 72 órán át különböző koncentrációjú vizes görögszéna extraktummal. A kezelés során kitűnik, hogy a 10,0,31% koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása jelentősen lecsökkent. Azonban a 0,16-0,04% 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. Az ilyen 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 (13. ábra).



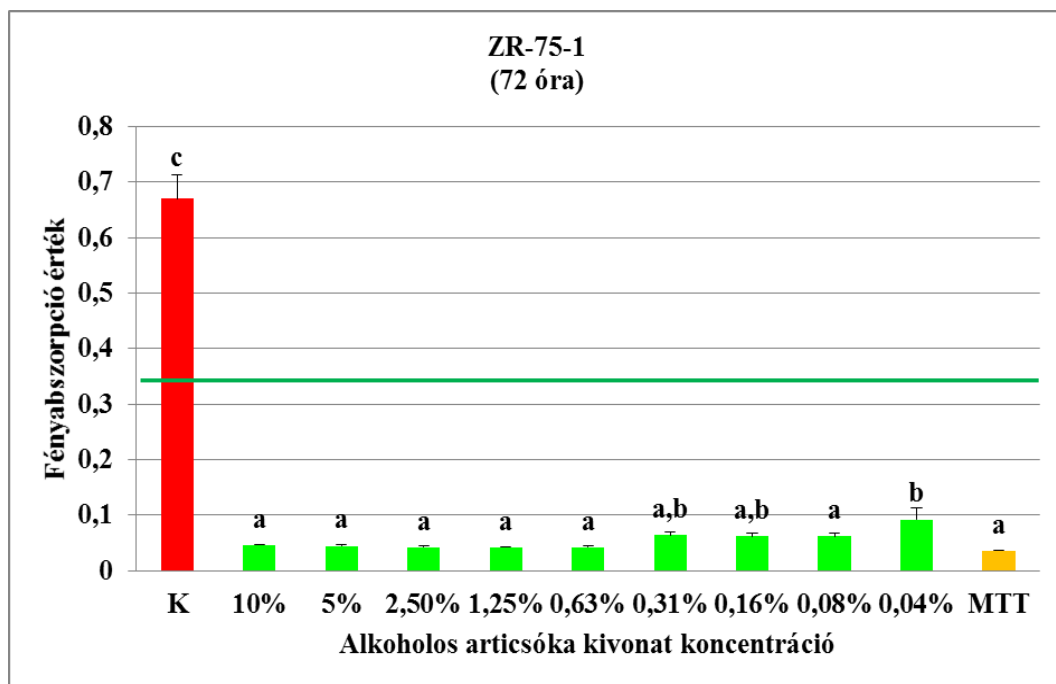
14. ábra: A vizes görögszéna kivonat hatása a ZR-75-1 emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 3 napos kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

A ZR-75-1 sejtvonalon a vizes görögszéna kivonat különböző koncentrációjú és 72 órás alkalmazásakor szintén bifázisos élettani hatást észleltem. A kezelés során 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 (14. ábra).



15. ábra: Az alkoholos 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 az alkoholos articsóka kivonat különböző koncentrációjú és 72 órás alkalmazása során erőteljes citotoxicitást figyeltem meg. A kezelés során kitűnik, hogy a 10-1,25%-os koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása jelentősen lecsökkent. A 0,31-0,08%-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 (15. ábra).

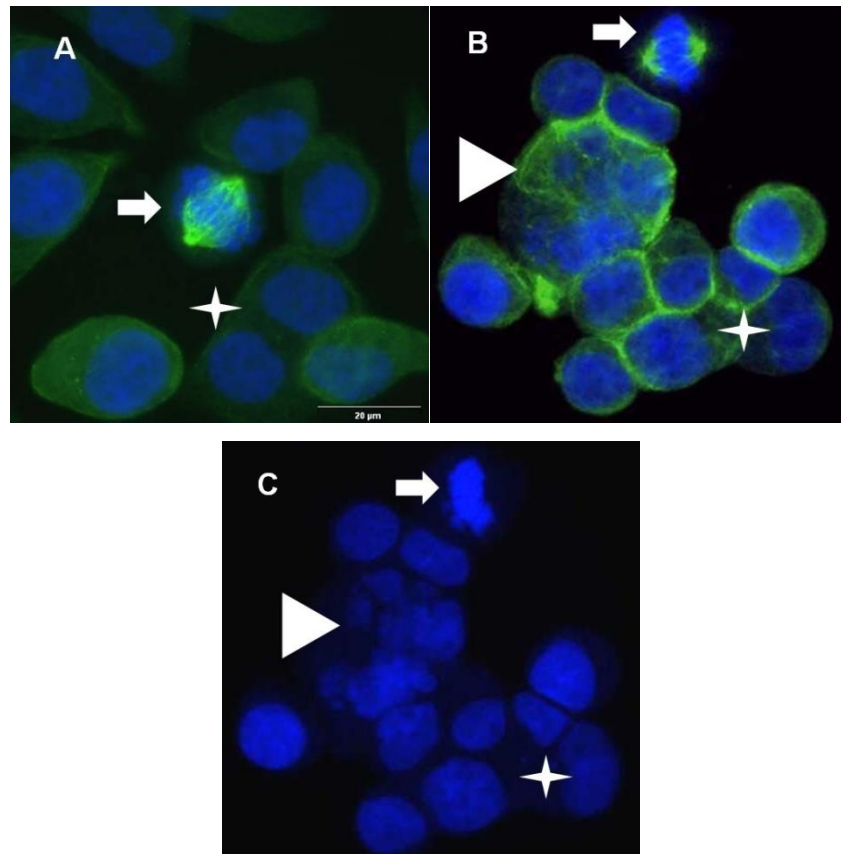


16. ábra: Az alkoholos articsóka kivonat hatása a ZR-75-1 emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 72 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

A ZR-75-1 sejtvonalon az alkoholos articsóka kivonat különböző koncentrációjú és 72 órás alkalmazása során a T-47D sejteken történő kezelés során leírt erőteljes citotoxicitást figyeltem meg (16. ábra).

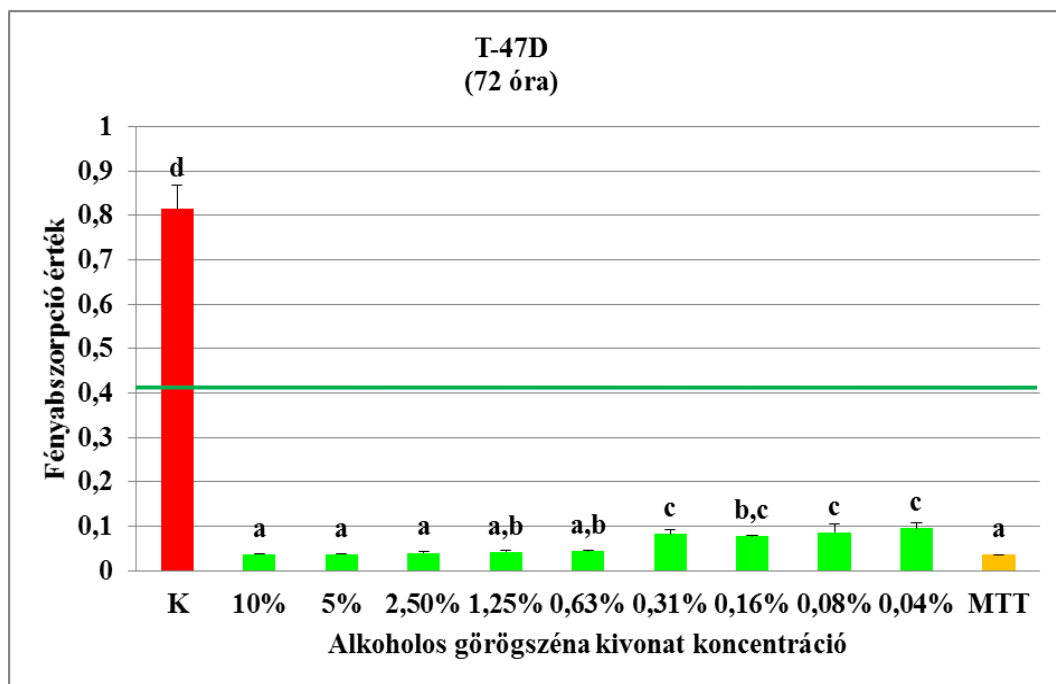
Annak érdekében, hogy további információkat szerezzek az alkoholos articsóka extraktumok indukálta citotoxikus hatásról, immunnhisztokémiai festésekkel tanulmányoztam a kezelt daganatos sejtek fenotípusát, beleértve azok kromoszóma struktúráját. Vizsgálataim során sikeresen detektáltam néhány interfázisban lévő-, mitotikus sejtet, poliploid sejteket, binukleáris sejteket, osztódási orsókat és multipoláris orsókat (17. ábra).

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

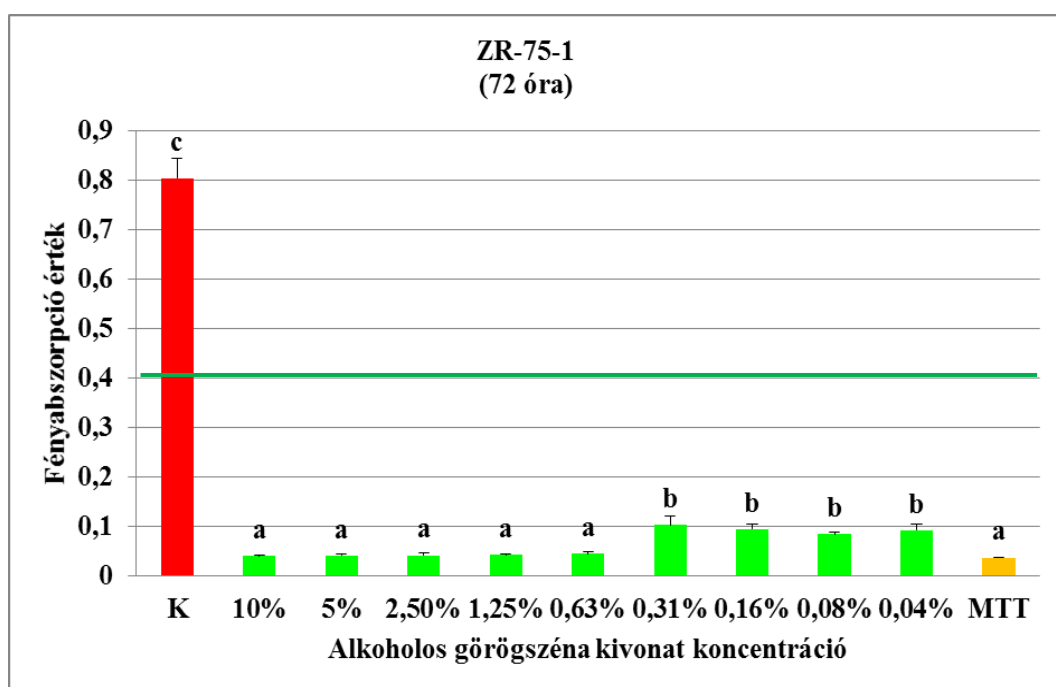


17. ábra: Articsóka kivonattal kezelt emlőtumoros sejtek immunfestés során. Ahol: A: Normál kinézetű sejtek interfázisban, mitotikus metafázisban (nyíl) és binukleáris sejtek (csillag); a zöld rész a mikrotubulusokat mutatja, míg a kék szín a DNS-t. B-C: Poliploid sejtek kromoszóma fragmentációval és/vagy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

A T-47D sejtvonalon történő 72 órás alkoholos görögszénával történő kezelés során megfigyelhető, hogy a 10-0,04%-os koncentráció tartományban a kezelt sejtek viabilitása jelentősen alacsony (18. ábra). Így kijelenthető, hogy a szerves görögszéna kezelések esetében erőteljes citotoxikus hatás figyelhető meg.



18. 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.

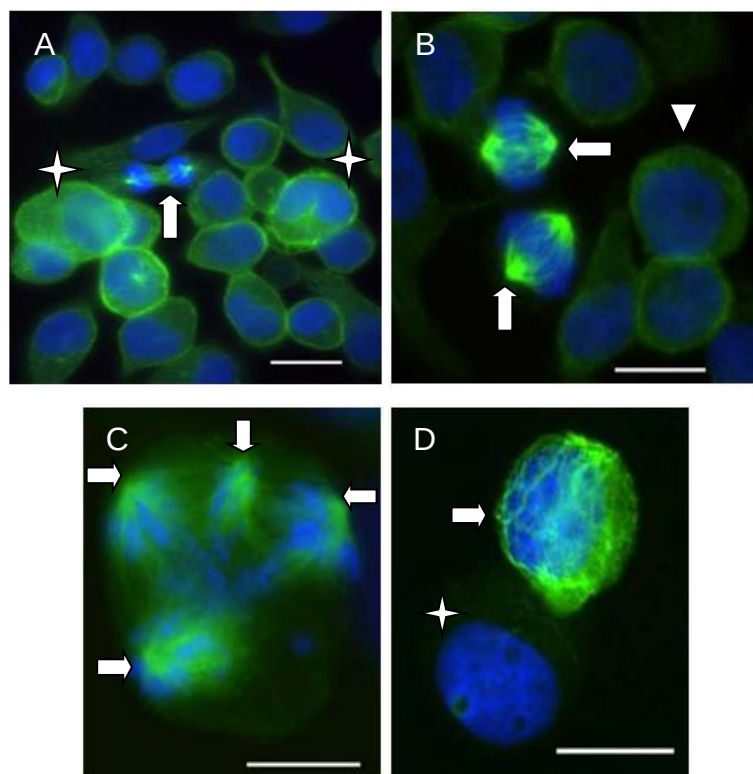


19. ábra: Az alkoholos görögszéna kivonat hatása a ZR-75-1 emlőkarcinóma sejtek proliferációjára 72 órás kezelést követően. K a kezeletlen pozitív kontroll csoport, MTT a sejtnélküli negatív kontroll csoport.

A ZR-75-1 sejtvonalon az alkoholos görögszéna kivonat különböző koncentrációjú 72 órás alkalmazása során a T-47D sejtvonalon elvégzett kezelés során leírt erőteljes citotoxicitást figyeltem meg (19. ábra).

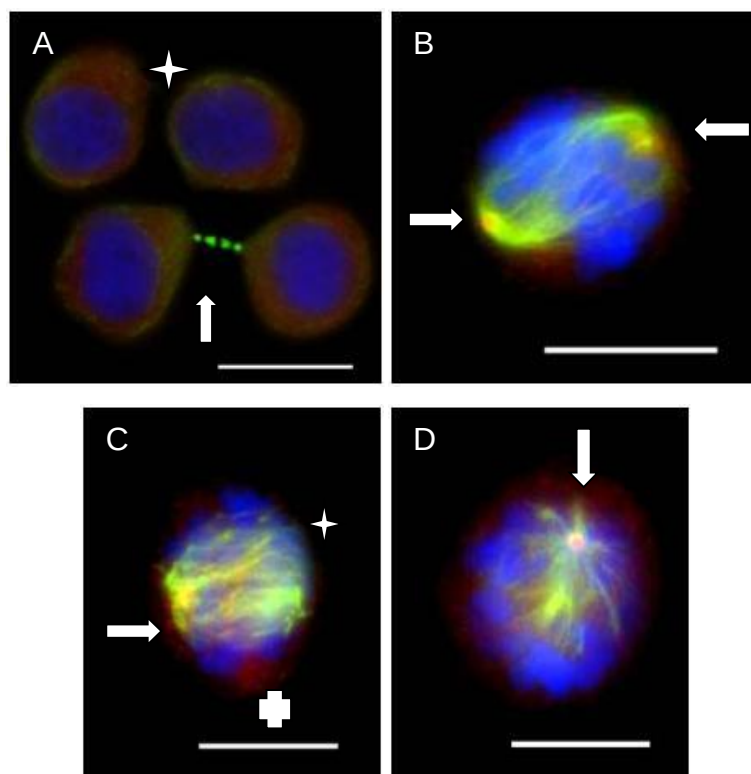
A fentiekben tapasztalt citotoxicitás további jellemzése érdekében immunocitokémiai festéseket végeztem a kezelt sejteken. Egy ilyen megközelítés megfelelhethet egy fenotípusos tanulmánynak, eltérően egy olyan klasszikus genetikai analízistől, ahol mutáns allélok idéznek elő fenotípusokat, hiszen jelen 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 beazonosítottam 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 (20. és 21. 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 (20. ábra).



20. ábra: 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-felhalmazódás az orsócsúcsokban (nyíl) D: Kivonattal kezelt sejt szétesőben lévő sejtmaggal („blubbing jelenség”) és abnormális mikrotubulus hálózattal (nyíl), közvetlenül összehasonlítva egy normál interfázisban lévő sejttel (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. Azért, hogy egy sokkal tisztább képet nyerjünk, a jövőbeni kutatásaim során szükséges lesz az összes kezelésbe vont sejt fenotípusát egy áramlási citométerrel (FACS; Fluoreszcencia Aktivált Sejtvalagotás és Analízis)



21. ábra: Görögszénamag kivonattal kezelt emlőtumoros sejtek immunfestés során. Ahol: A: Normál sejtek interfázisban (csillag) és citokinezis (nyíl). B: 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.

4. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI

1. A szárított articsóka levelekből készített vizes és alkoholos kivonataimban beazonosított 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); tricin-7-O-glükozid, genisztein, 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.

5. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA

A disszertációmban összefoglalt 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.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- American Cancer Society, Cancer Facts & Figures, Atlanta, 2016.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Tompa A.: 2011. Daganatos betegségek előfordulása, a hazai és nemzetközi helyzet ismertetése. *Magyar Tudomány.* 11: 1333-1345.
- 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.

7. 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

Idgen 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. Babes-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. Babes-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 Fejlődéshiológiai 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.

