

Etnomedicinában használt gyógynövénykivonatok sebgyógyulásra kifejtett hatásainak vizsgálata *in vitro* sejtkultúra modellben

Doktori (PhD) értekezés

Csepregi Rita Klaudia

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskolavezető: Prof. Dr. Bogár Lajos, egyetemi tanár

Programvezető: Prof. Dr. Miseta Attila, egyetemi tanár

Témavezető:

Prof. Dr. Kőszegi Tamás, egyetemi tanár



Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ

Laboratóriumi Medicina Intézet

Pécs

2021

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
I. BEVEZETÉS.....	7
II. IRODALMI ÉS METODIKAI ÁTTEKINTÉS	8
II.1. Az etnomedicina története a kezdetektől napjainkig	8
II.2. Erdélyi népi gyógyászat és kutatás jelentősége	10
II.3. A sebgyógyulás folyamata.....	10
II.4. A sebgyógyulásban hasznos növényi hatóanyagok	13
II.4.1. Polifenolok csoportosítása	13
II.4.1.1. Flavonoidok.....	13
II.4.1.2. Fenolsavak.....	15
II.5. Növényi komponensek biológiai hatása a sebgyógyulásban.....	15
II.5.1. Gyulladáscsökkentő hatás	15
II.5.2. Sejtmigráció és proliferáció serkentése	16
II.5.3. Antioxidáns hatás.....	18
II.5.4. Antimikrobás hatás	21
II.6. Az általunk vizsgált gyógynövények általános előfordulása, morfológiai, fitokémiai és népgyógyászati jellemzői	22
II.6.1. Réti nyúlszapuka (<i>Anthyllis vulneraria</i> L.).....	22
II.6.2. Télálló fukszia (<i>Fuchsia magellanica</i> Lam.) és korallfukszia (<i>Fuchsia triphylla</i> L.).....	23
II.6.3. Pénzlevelű lizinka (<i>Lysimachia nummularia</i> L.)	24
II.7. A sebgyógyulás hátterében álló folyamatok <i>in vitro</i> metodikai vizsgálata	25
II.7.1. A sebgyógyulás <i>in vitro</i> modellezése	25
II.7.2. A növényi kivonatok citotoxicitás/dózis-hatás méréseinek lehetőségei	25
II.7.3. A növényi kivonatok nem enzimikus, teljes antioxidáns kapacitásának (TAC) mérési lehetőségei.....	28
II.7.3.1. Az általunk vizsgált hidrogénatom átvitelen (HAT) alapuló módszerek	29
II.7.3.1.1. Oxigéngyök Abszorpciós Kapacitás – Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)	29
II.7.3.1.2. Erősített kemilumineszcenciás teszt (ECL)	29
II.7.3.2. Az általunk vizsgált egy elektron átvitelen (SET) alapuló módszerek	30
II.7.3.2.1. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás mérése.....	30
II.7.3.2.2. Troloxra vonatkoztatott Antioxidáns Kapacitás – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC).....	30
II.7.4. Az intracelluláris ROS és antioxidáns kapacitás mérése	31

II.7.5. Antimikrobás vizsgálatok: minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása.....	32
II.8. A ciklodextrinek, mint „gazdamolekulák” (mikrokapszulázás).....	32
III. CÉLKITŰZÉSEK	33
III.1. Citotoxicitást mérő új metodika kidolgozása valamint az elérhető tesztek megbízhatóságának tesztelése	33
III.2. A sebgyógyulásban szerepet játszó gyógynövények kémiai és biológiai vizsgálata	33
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	35
IV.1. Sejt alapú citotoxicitás mérések	35
IV.1.1. Sejtek fenntartásához szükséges anyagok	35
IV.1.2. Sejtkultúrák	35
IV.1.3. Többparaméteres citotoxicitás teszt beállítása lemezolvasón	35
IV.1.3.1. Alkalmazott oldatok és reagensek	35
IV.1.3.2. Mérés menete.....	36
IV.1.4. β -ciklodextrinek hatása a rezazurin fluoreszcenciás életképességi tesztre.....	37
IV.1.4.1. Alkalmazott vegyszerek és oldatok	37
IV.1.4.2. A ciklodextrinek molekuláris kölcsönhatásainak mérése fluoreszcencia spektroszkópiával.....	37
IV.1.4.3. A CD-ek hatása a sejtes citotoxicitás mérésekre	38
IV.2. Erdélyi népgyógyászati adatok alapján kijelölt növényi kivonatok vizsgálata.....	38
IV.2.1. Etnobotanikai kutatás Erdélyben.....	38
IV.2.2. A vizsgált növényfajok gyűjtése és kivonatok készítése.....	39
IV.2.2.1. Növénygyűjtés menete.....	39
IV.2.2.2. Alkalmazott oldatok.....	40
IV.2.2.3. Kivonatok készítése	40
IV.2.3. Polifenol analízis nagynyomású folyadékkromatográf (HPLC) diódasoros detektorral és elektropray ionizációval kapcsolt MS készülékkel	41
IV.2.3.1. Alkalmazott oldatok.....	41
IV.2.3.2. Analízis	41
IV.2.4. A növényi kivonatok citotoxicitásának tesztelése	42
IV.2.4.1. Alkalmazott oldatok és reagensek	42
IV.2.4.2. Citotoxicitás mérés lemezolvasóval	42
IV.2.4.3. Citotoxicitás mérése áramlási citométerrel.....	42
IV.2.5. Antimikrobás hatás vizsgálata.....	43
IV.2.5.1. Vizsgált baktériumtörzsek és alkalmazott oldatok	43
IV.2.5.2. MIC ₈₀ értékének meghatározása mikrodilúciós módszerrel	43

IV.2.6. Nem enzimatis, kémiai antioxidáns kapacitás vizsgálatok	44
IV.2.6.1. Alkalmazott oldatok és reagensek	44
IV.2.6.2. Oxigényök Abszorpciós Kapacitás – ORAC.....	44
IV.2.6.3. Erősített kemilumineszcencián alapuló módszer – ECL	45
IV.2.6.4. DPPH gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás mérése.....	45
IV.2.6.5. Troloxra vonatkoztatott Antioxidáns Kapacitás – TEAC.....	45
IV.2.6.6. TAC értékek elemzése	45
IV.2.7. Az intracelluláris antioxidáns kapacitás mérése.....	46
IV.2.7.1. Alkalmazott oldatok és reagensek	46
IV.2.7.2. Mérés menete.....	47
IV.2.8. A sejtmigráció („sebgyógyulás teszt”) <i>in vitro</i> vizsgálata	47
IV.2.8.1. Alkalmazott oldatok és reagensek	47
IV.2.8.2. Mérés menete.....	48
IV.2.9. Fehérjeexpressziós vizsgálatok	48
IV.2.9.1. Alkalmazott oldatok és reagensek	49
IV.2.9.2. Mérés menete.....	50
IV.2.10. Statisztikai analízis.....	51
V. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	52
V.1. Sejtalapú citotoxicitás tesztek kidolgozása és megbízhatóságuk vizsgálata	52
V.1.1. Új, többparaméteres citotoxicitás módszer kidolgozása lemezolvasóra.....	52
V.1.2. β -ciklodextrinek hatásának vizsgálata rezazurin viabilitás teszttel, illetve ATP- és fehérjetartalom meghatározásával	56
V.1.2.1. Rezorufin-CD kölcsönhatások vizsgálata fluoreszcencia spektroszkópiai módszerrel.....	56
V.1.2.2. Reszazurin alapú sejtes viabilitás mérések eredményei lemezolvasón.....	58
V.2. Etnobotanikai gyűjtések eredményei.....	62
V.3. Növényi kivonatok fenolos vegyületeinek szemi-quantitatív elemzése LC-DAD-ESI-MS / MS készülékkel	63
V.4. Növényi kivonatok dózis-hatásának vizsgálata.....	65
V.4.1. A lemezolvasón mért citotoxicitás vizsgálatok eredményei.....	65
V.4.2. Áramlási citométeren mért citotoxicitás vizsgálatok eredményei	67
V.5. MIC értékek meghatározása antimikrobiális hatás vizsgálatához.....	68
V.6. Teljes antioxidáns kapacitás vizsgálatok eredményei	70
V.7. Az intracelluláris ROS mérések eredményei.....	73
V.8. Az <i>in vitro</i> migrációs teszt eredményei	75
V.9. Jelátviteli folyamatok eredményei western blot technikával.....	77

V.9.1. A gyulladáscsökkentő hatás jelátviteli vizsgálata fehérjeszinten	77
V.9.2. Az antioxidáns hatás jelátviteli vizsgálata fehérjeszinten	79
V.9.3. A migrációt, proliferációt és sejttúlélést serkentő hatások jelátviteli vizsgálata fehérjeszinten.....	80
VI. ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	83
VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	86
VIII. IRODALOMJEGYZÉK	88
IX. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK, ELŐADÁSOK LISTÁJA	106
X. MELLÉKLETEK.....	110

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3T3: normál egér embrionális fibroblaszt sejtvonala

7AAD: 7-aminoaktinomicin D

A549: humán tüdőkarcinóma sejtvonala

ABTS: 2,2-azino-bisz-3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav

Akt: protein kináz B

ATP: adenzin-trifoszfát

AUC: görbe alatti terület

BCD: béta-ciklodextrin

BSA: szarvasmarha szérumbalbumin

CAT: kataláz

CD: ciklodextrin

CHX: cikloheximid

COX2: ciklooxygenáz-2

DAD: diódasoros detektor

DCFH-DA: 2',7'-diklór-fluoreszcein-diacetát

DHR123: dihidrorodamin 123

DIMEB: heptakis-2,6-di-ometil-béta-ciklodextrin

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DPPH: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil

ECL: erősített kemilumineszcens teszt

Erk1/2: extracelluláris szignál által szabályozott kináz 1 és 2

ESI: elektroporlasztásos ionizáció

FBS: főtális szarvasmarha savó

FITC: fluoreszcein-izotiocianát

FMO: fluoreszcencia mínusz egy

GFP: zöld fluoreszcens fehérje

H₂O₂: hidrogén-peroxid

HaCaT: normál humán keratinocita sejtvonala

HepG2: humán hepatoma sejtvonala

HPBCD: hidroxipropil-béta-ciklodextrin

HPLC: nagy hatékonyságú folyadékromatográfia

iNOS: indukálható nitrogén-monoxid szintáz

JNK vagy SAPK: c-Jun N-terminális kináz vagy stressz aktivált protein kináz

LPS: lipopoliszacharid

MAPK: mitogén aktivált protein kináz

MIC₈₀: minimális 80%-ot gátló koncentráció

MOPS: 3-N-morfolin-propánszulfonsav

MS/MS: tandem tömegspektrometria

NaF: nátrium-fluorid

NEAA: nem esszenciális aminosav

NF- κ B: gyulladássos transzkripció faktor

-OH: hidroxil csoport

\cdot OH: hidroxil gyök

ORAC: oxigén gyök abszorbancia kapacitás

OTA: ochratoxin A

PB: Pacific Blue

PBS: foszfát pufferolt sóoldat

PCA: főkomponens analízis- Principal Component Analysis

PDGF-BB: vérlemezke eredetű növekedési faktor

PI: propidium-jodid

PI3K: foszfatidilinozitol 3 kináz

PVDF: polivinil-difluorid

ROS: reaktív oxigén származékok

RPMI: Roswell Park Memorial Institute (tápoldat)

SD: mintából számított tapasztalati szórás (standard deviation)

SDS-PAGE: nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis

SEM: mintából számítható 'átlag szórása' (standard error of the mean)

SOD: szuperoxid dizmutáz

TAC: teljes antioxidáns kapacitás

TBS: tris pufferolt sóoldat

TEAC: troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitás

TGF- β : transzformáló növekedési faktor béta

TNF- α : tumor nekrozis faktor alfa

TRIS: trisz-(hidroximetil)-amino-metán

TX-100: triton X-100

VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

I. BEVEZETÉS

A gyógynövények alkalmazása világszerte, így Európában is, több ezer éves múltra tekint vissza. Felfedezésük elsősorban gyakorlati tapasztalatokon alapult, így a hatékonyak véltek beépültek a mindennapi orvoslás gyakorlatába. Még ma is, a világ jelentős részén a gyógynövénykincs az egyedüli forrás a betegségek kezelésében. Ehhez érdemes hozzátenni, hogy a modern medicinában használt szerek jelentős hányada is növényi eredetű (pl. digoxin, merckformin, vincristin, stb.) Mindezek alapján választottam a PhD dolgozatom témájának a gyógyhatású növények vizsgálatát, hiszen ezek kutatása, további jótékony drogrészek megismerése, hatóanyagok vizsgálata a mai fitoterápia szempontjából kiemelkedően fontosak.

Munkánk során olyan gyógynövények vizsgálatát céloztunk meg, amelyeket ma is használnak a népi gyógyászatban, de fitokémiai összetételük és farmakológiai hatásaik alig ismertek. Vizsgálataink fókusza Erdély olyan részeire terjedt, ahol jelenleg sincs állandó orvosi/gyógyszertári ellátás. Ezen belül is a népi gyógyászatban a mai napig használt olyan gyógynövények keltették fel érdeklődésemet, melyek alkalmasak bizonyos bőrbetegségek kezelésére, illetve elősegítik a sebgyógyulást.

PhD tanulmányaim során megvizsgáltuk a kijelölt növények 50%-os etanolos és vizes kivonatainak fitokémiai összetételét, citotoxicitását, antimikrobás és antioxidáns, valamint a sejt migrációra (sebgyógyulás modell) gyakorolt hatását. Végezetül fehérje expressziós mérésekkel több jelátviteli útvonalat jellemeztünk, melyek fontosak a gyulladáscsökkentő, antioxidáns hatások és a sejt migráció szabályozásában.

II. IRODALMI ÉS METODIKAI ÁTTEKINTÉS

II.1. Az etnomedicina története a kezdetektől napjainkig

A növényekkel és növényi készítményekkel történő különböző humán és állati betegségek kezelése már az ókortól kezdve megfigyelhető. Tekintettel arra a tényre, hogy abban az időben nem volt elegendő információ sem a betegségek okairól, sem arról, hogy mely növényfajt hogyan lehet gyógyításra felhasználni, az ehhez kapcsolódó tudás főként a generációk között átörökített tapasztalatokon alapult. A felhalmozott ismeretek birtokában idővel kiderült, hogy bizonyos gyógynövények mely betegségek kezelésére alkalmazhatók [1,2].

A legrégebbi írásos bizonyítékát gyógynövények gyógyszerkészítményként történő alkalmazásáról egy közel 5000 éves sumér agyaglapon találták, amely 12 gyógyszerkészítési receptet tartalmazott. Ezek több mint 250 növényfajra vonatkoztak (például a mák) [1].

A gyökerekről és füvekről szóló első kínai gyógynövénykönyv a „Pen T'Sao”, amelyet Sen Nang császár írt i.e. 2500 körül. Könyvében 365 gyógyszert (gyógynövények szárított részeit) említ, amelyek közül számos drogot napjainkban is használnak, pl. kámfor, ginzeng, csattanó maszlag, fahéj és csikófark [2,3].

Az indiai népgyógyászat közel egyidősnek tekinthető a hagyományos kínai orvoslással. Az indiai szent könyvek, a Védák azokat a növényekkel való kezeléseket említik, amelyek növényi alapanyagai bőségesen rendelkezésre állnak az adott országban. Számos, manapság is használt fűszernövény Indiából származik, pl. a szerecsendió, bors, szegfűszeg [2,4].

Az ókori egyiptomi kultúrából az i.e. 1500 körül keletkezett Ebers-papirusz kiemelendő, amely több mint 800 gyógyszerkészítményt és 700 növényfajt sorol fel, közöttük napjaink terápiájában is használt növényeket, például gránátalma, ricinus, aloe, fokhagyma, vöröshagyma, füge, fehér fűz, koriander és közönséges boróka [5,6].

Az ókori görög és római kultúrában az orvosok rendszerezték a gyógynövényismeretet és a felhasználást [2].

A gyógynövényeket a középkorban elsősorban egyszerű gyógyszerformákként használták – tinktúrák (alkoholos kivonat), főzetek (vizes kivonat) és macerátumok (olajos kivonat) –, különösen a 16-18. században. Később az összetett gyógyszerformák iránti igény egyre nőtt, amelyek gyógynövényeken kívül ritka állati és ásványi anyagokat is tartalmaztak [2,7,8].

A 19. század eleje fordulópontot jelentett a gyógynövények ismeretében és felhasználásában. Az alkaloidok felfedezése és izolálása pl. mákból, kínafából és gránátalmából stb., majd a speciális anyagcseretermékek különféle glikozidos formáinak izolálása jelentette a tudományos gyógyszerkutatás kezdetét. Később a kémiai módszerek korszerűsítésével további növényi eredetű hatóanyagokat is felfedeztek, például a tanninokat, a szaponinokat, a vitaminokat stb. [2,9].

A 19. század végén és a 20. század elején fennállt az a veszély, hogy a gyógynövényeket kiiktatják a hivatalos orvoslásból. Számos forrásmunka szerint a növényi gyógyszerek csökkent hatékonyságáért bizonyos enzimek tehetők felelőssé, amelyek alapvető változásokat okoznak a gyógynövények szárítása során, így a gyógynövények hatása a szárítás módjától is függ. A 19. században a tiszta formában izolált terápiás szerek, alkaloidok és egyéb speciális növényi anyagcseretermékek (polifenolok glikozidos formái) egyre inkább kiszorították azokat a gyógynövényeket, amelyekből izolálták őket. Ennek ellenére azt tapasztalták, hogy bár a tiszta alkaloidok hatása gyorsabb, azonban a természetes növényi eredetű alkaloidok hatása tartósabb volt. Ezek után a 20. század elején javaslatot tettek a friss gyógynövények stabilizálási módszereire, különösen azokra, amelyek kémiai szerkezetüket tekintve labilis gyógyászati komponensekkel rendelkeznek [2,10].

A történelmi távlatok és a mai adatok ismeretében napjainkban az Egészségügyi Világszervezet (WHO) szerint a világ népességének 60%-a gyógynövény alapú gyógyszerekre támaszkodik, továbbá a fejlődő országok lakosságának 80%-a szinte teljesen ettől függ elsődleges egészségügyi szükségleteik szempontjából [int. hiv. 1 -WHO 2002].

A növényi vegyületek és kémiai analógjaik számos, klinikai szempontból jelentős gyógyszert szolgáltattak krónikus és akut betegségek kezelésében. Egyes ősi civilizációk, mint India, Kína, Dél-Amerika és Egyiptom lakossága napjainkban is számos növényi alapú gyógymódot alkalmaz a különféle betegségek kezelésére. A WHO szerint a gyógynövények, a növényi alapanyagok és a növényi gyógyszerek kereskedelme évente mintegy 15%-kal növekszik. A növényi kivonatokkal való kezelés könnyen hozzáférhető és viszonylag biztonságos, így folyamatosan növekszik az érdeklődés a természetes vegyületek felhasználása iránt, pl. bőrbetegségek megelőzésére és leküzdésére [11]. Napjainkban a különböző típusú sebek kezelése a népi orvoslásban külsőleg történik növényi főzetek, tinktúrák, kenőcsök, olajok formájában, vagy direkt módon nyersen, borogatásként alkalmazva a sérült bőrfelületen. Ezen kívül hagyományos gyógyszerekben a polifenolokat használják széles körben számos krónikus bőrbetegség, például pikkelysömör és vitiligo (pigmenthiány) kezelésére [12].

II.2. Erdélyi népi gyógyászat és kutatás jelentősége

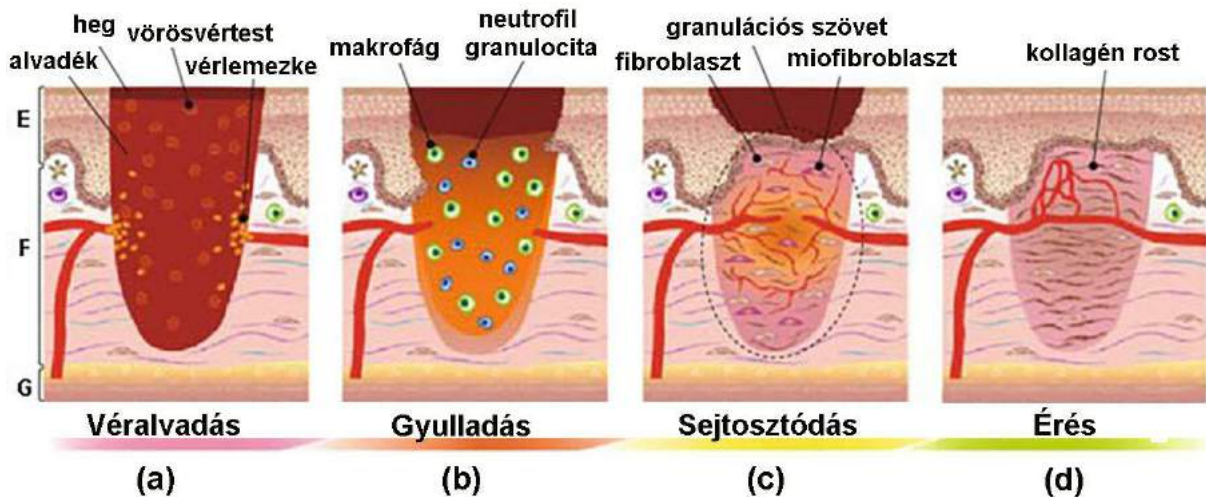
Erdély, Románia részeként Közép-Európában található, amely változatos növény- és állatvilágot foglal magába, beleértve az endemikus és betelepített fajokat is. A régióban a 16. századtól kezdve közöltek etnobotanikai és népgyógyászati feljegyzéseket. Az első, kézzel írott orvosi mű az *Ars Medica* [13], amely növényi, állati és ásványi eredetű gyógyszereket tartalmaz, közel 1000 oldalon [14]. Ezt követte Melius Juhász Péter *Herbárium*a, amely 275 gyógynövény több mint 1200 népi nevét tartalmazta [15]. A 17-19. század után az 1960-as évektől kezdve számos etnobotanikai felmérés indult Erdélyben, amelyek a növények helyi használatának hagyományos ismereteit összegzik [16,17]. A témában számos térségről közöltek magyar és román nyelven adatokat, amelyek között a dolgozat témájához kapcsolódó, székelyföldi Homoród-völgy korábbi kutatásait emeljük ki. Gub Jenő a térség néhány települését kutatva értékes feljegyzéseket tett közzé vadon élő és termesztett növényfajok helyi felhasználásáról. Ezek az adatok a növények népi/helyi elnevezését, a felhasznált növényi részeket, az egyes betegségekre ajánlott kezelést, valamint a növényekkel kapcsolatos népi hiedelmeket tartalmazzák [18-20].

A gyógyhatású növények használata Erdély bizonyos régióiban, így Székelyföldön napjainkban is széles körben elterjedt. Ezeken a területeken az elszigetelt falvakban élő idősebb nemzedék körében jellemző, hogy az állandó orvosi, állatorvosi és gyógyszerári ellátás hiányában generációs tapasztalatokon alapuló szerekkel, módszerekkel kezelik az egyes betegségeket. Ennek oka a vidéki ember életmódján alapszik, aki fizikai munkát végez főleg mezőgazdaságban, pásztorkodásban vagy méhészetben a megélhetésért. Ez az életmód szoros kapcsolatot igényel az ember és a természetes környezet között, beleértve az etnodermatológiai gyakorlatok ismeretét humán és állatorvosi szempontból egyaránt. Az életmódból fakadóan az elszigetelt közösségekben élők nagyon gyakran szembesülnek fizikai sérülésekkel, ezért a sebgyógyulást pozitívan befolyásoló gyógynövényeknek itt kiemelt szerepük van.

II.3. A sebgyógyulás folyamata

A sebgyógyulás jellemzése előtt fontos megemlíteni a seb definícióját, amelyet Lazarus és munkatársai az alábbi módon fogalmaztak meg: sebnek nevezzük a külső hatásra létrejövő, normál anatómiai struktúra sérülését, ami a hámszövet folytonosságának elvesztéséhez vezet. A sebek mechanikai, termikus, kémiai úton vagy sugárzás hatására keletkezhetnek [21].

A bőr az emberi test egyik legnagyobb felületű szövete, megvédi a belső szerveket a mikrobafertőzésektől és a sérülésektől. A sebgyógyulás mechanizmusa nélkülözhetetlen az elveszített szövetek visszaszerzése és a szövetek homeosztázisának fenntartása érdekében. Az új szövetképződés összetett folyamat, amely 4 fő lépésből áll: véralvadás, gyulladás, sejtszótódás és érés, magába foglalva különböző a sejtípusok, valamint szövetek közötti komplex kölcsönhatást (1. ábra).



1. ábra. A sebgyógyulás fázisai: véralvadás (a); gyulladás (b); sejtszótódás (c); és érés (d). A bőr rétegei: felhám-epidermisz (E); irha-dermisz (F) bőrálja-hipodermisz (G) [22]

A sebgyógyulás folyamatának legelső fázisa a véralvadás, amely a sebzés bekövetkezése után kezdődik. A sérült vérerek először összehúzódnak, majd a defektust véralvadék dugó tölti ki, amely a vérlemezkék aggregációja és szöveti alvadási faktorok felszabadulása következtében létrejött fibrinhálózat, sejteket is magába zárva (1. ábra, a). A folyamat során a véralvadási és a komplement kaskád egyaránt aktiválódik. A károsodott szövetben tromboxán szabadul fel, amely a vérerekben simaizom összehúzó hatású, valamint elősegíti a trombociták aktivációját és aggregációját. A fibrinképződés gátat jelent a mikroorganizmusok támadása ellen, véd a kiszáradás ellen, segíti a kollagén beépülését, továbbá fenntartja a bőr integritását [23-25].

A következő fázis az gyulladás, amelynek korai szakaszában a sérült szövetből, valamint a trombocitákból hisztamin, proteázok, transzformáló növekedési faktor béta (TGF- β), vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) valamint citokinek szabadulnak fel, amelyek kemotaktikus szignálként hatnak a fehérvérsejtekre. Aktiválják továbbá a fibroblasztokat, fokozzák az endotél sejtek működését és a vazokonstriktiót. A véredények falán keresztül gyulladásgos sejtek, elsősorban neutrofil granulociták lépnek be a sebzési

területre, majd őket követik a makrofágok (1. ábra, b). A neutrofil granulociták fő feladata a sebtisztítás, amely az idegen anyagok fagocitózist jelent. A 2. nap után a késői gyulladásos szakaszban a neutrofil granulocitákat makrofágok váltják fel, amelyek a fagocitózis mellett növekedési faktorokat (PDGF, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor - VEGF, TGF- β , fibroblaszt növekedési faktor – FGF), citokineket és szabad gyököket termelnek. Mindezek elősegítik az endotél sejtek, a fibroblasztok és a keratinociták migrációját a sebzési területre, elindítva ezzel a proliferációs fázist. A prosztoglandinok termelésével pedig segítik az erek összehúzódását [23,25].

A sejtosztódás fázisa magába foglalja a véredényképzést, a kötőszövetképződést, valamint a hámosodást, amely a sebzéstől számítva a 3-4. napon kezdődik és a 14-15. napig tart. A véredényképzés a növekedési faktorok által szabályozott folyamat, amely az endotélsejtek aktivációjával indul meg, magába foglalva a bazális membrán szétörését és újraszerveződését (1. ábra, c). Az első hét végén fibroblasztok halmozódnak fel a sebzés körül, amelyek a kötőszövet képzésében játszanak nélkülözhetetlen szerepet. A kezdeti szakaszban a fibroblasztok a kollagén III-as típusának a termelését végzik, míg a későbbi periódusban, illetve az érési fázisban már az erősebb, I-es típusú kollagén termelése fokozódik. A kollagén rostok keresztkötéseinek köszönhetően egy merev extracelluláris mátrix struktúra jön létre [23,25].

Az érés fázisa a sebzéstől számított 15. naptól kezdődik és akár 6 hónapig is tarthat. Amint a sebzési felület fedetté válik keratinocitákkal, megszűnik az epidermális migráció, kialakul az új epidermisz az alatta lévő helyreállított bazális membránnal (1. ábra, d). A seb bezáródását követően a III-as típusú kollagén szintézise teljesen leáll, csak a kollagén I-es típusát termelik a fibroblasztok. Ennek szabályozását növekedési faktorok végzik, mint például a TGF- β , valamint az FGF. A fibroblasztok a fenotípusváltásnak köszönhetően ideiglenesen alfa-simaizom aktint expresszálnak. Az így keletkező miofibroblasztok segítségével a rostok összehúzódhatnak, aminek a következtében a heg kisebb lesz [23,26].

Az élő szervezetek normál működése közben, így a sebgyógyulás során is reaktív oxigén származékok (ROS) keletkezhetnek, elsősorban a mitokondiumokban, a peroxisómákban és a kloroplasztiszokban (növények). Ezek a szabad gyökök a külső elektronhéjukon egy párosítatlan elektront tartalmaznak, emiatt nagyon instabilak és reaktívak, ugyanis képesek közvetlen károsodást okozni a sejt-komponensekben, mint a nukleinsavakban (pl. DNS és RNS károsítás), a fehérjékben (pl. fehérje oxidáció, enzimgátlás) és a lipidekben (pl. membránlipidek peroxidációja). A leggyakrabban keletkező ROS-ok a szuperoxid gyök (O_2^-), a peroxil gyök ($\text{ROO}\cdot$), az alkoxil gyök ($\text{RO}\cdot$), a hidroxil

gyök ($\cdot\text{OH}$), valamint nem gyökös tulajdonságúak, de szabad gyökként említik a szinglet oxigént ($^1\text{O}_2$), a hipoklórossavat (HOCl), az ózont (O_3) és a hidrogén-peroxidot (H_2O_2) [27]. Ezek a molekulák különböző biológiai funkciókban vehetnek részt, ilyen például a sebgyógyulás (elsősorban H_2O_2), a tanulás és memória ($\cdot\text{O}_2^-$, és H_2O_2) vagy az intracelluláris jelátvitel (főleg H_2O_2) [28].

A ROS-ok (főként H_2O_2) több ponton is befolyásolják a sebgyógyulást [29]:

1. Véralvadás: korai ROS mediált vérzéscsökkentés a vérerek összehúzódása miatt, valamint a vérlemezkék aktiválása és így a vérrög kialakulása.
2. Leukocita toborzás: a ROS szignálnak köszönhetően gyors neutrofil, majd későbbi makrofág migráció a helyi vérerekből a sebzési területre.
3. Patogének elleni védelem: a baktériumok és gombák fagocitózisa révén a neutrofil granulocitákból és a vérlemezkékből egyaránt nagy mennyiségű ROS (elsősorban H_2O_2 és $\cdot\text{O}_2^-$) szabadul fel, amely bakteriosztatikus hatása révén megakadályozza a patogén baktériumok szaporodását.
4. Szöveti regenerálás: a ROS felszabadulás serkenti az endotélsejtek migrációját és osztódását, elősegítve a véredényképzést. Továbbá fokozza a keratinociták és fibroblasztok migrációját és proliferációját, beleértve a kollagénszintézist is.

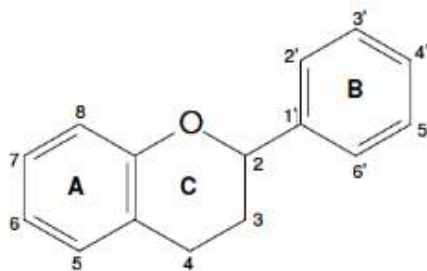
II.4. A sebgyógyulásban hasznos növényi hatóanyagok

II.4.1. Polifenolok csoportosítása

A polifenolos vegyületek olyan speciális anyagcseretermékek, amelyek egyenlőtlen mennyiségben és formában fordulnak elő a növényekben. A polifenolokon belül számos vegyületcsoportot lehet elkülöníteni, mint például a fenolsavak, a flavonoidok, a sztilbének és a lignánok, amelyek alapvető szerkezetükben eltérőek, de mindegyikük rendelkezik aromás gyűrűvel, amely 1 vagy több hidroxilcsoportot ($-\text{OH}$) tartalmaz [30]. A gyógynövények ezen aktív összetevői többféle úton (antimikrobás, antioxidáns, gyulladáscsökkentő hatás, valamint proliferációs és migrációs aktivitásnövelés) is serkenthetik a sebgyógyulás folyamatát [25]. A következőkben a polifenolok két fontos csoportját ismertetem röviden.

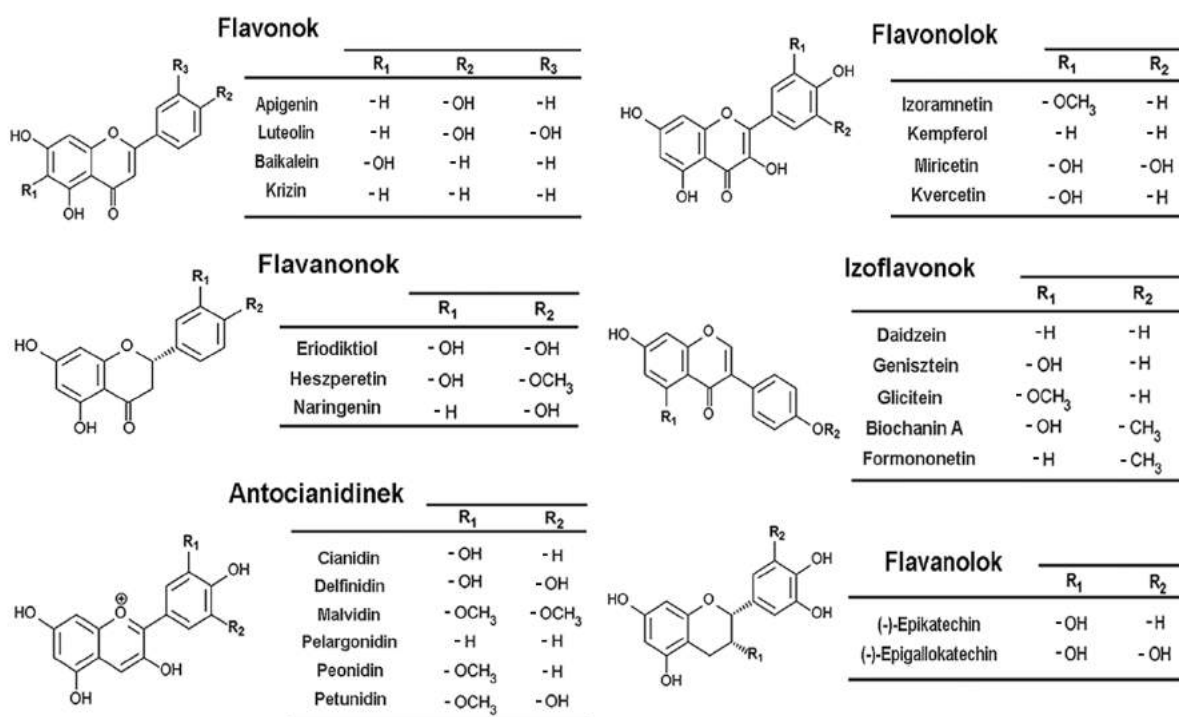
II.4.1.1. Flavonoidok

A flavonoidok általános szerkezeti jellemzője a C6-C3-C6 (difetil-propán váz) alapszénváz, melyben a két benzolgyűrű (A és B) egy oxigénatomot tartalmazó heterociklikus pirángyűrűn (C gyűrű) keresztül kapcsolódik egymáshoz (2. ábra).



2. ábra. Flavonoid alapváz [31]

A C-gyűrű oxidáltsága, valamint a második fenolgyűrű térállása alapján 6 flavonoid alcsoportot lehet elkülöníteni (3. ábra): flavonok, flavanonok, flavonolok, izoflavonok, flavan-3-olok (katechin monomerek és kondenzált tanninok - proantocianidinek) és antocianidinek [32]. A flavonoidok nagyfokú szerkezeti változatosságát a különböző enzimek általi szubsztitúció (hidroxilezés, metilezés, szulfonálás, acilezés vagy glikozilálás) okozza. A katechineket kivéve, leggyakrabban glikozidos származékként (aglikon + cukorkomponens) fordulnak elő a növényekben [32-35]. Attól függően, hogy az aglikonhoz mely atomon keresztül kapcsolódik a cukormolekula, több típust is megkülönböztetünk. A leggyakoribbak az O-glikozidok (pl. hiperozid, rutin), amelyeknél az aglikon -OH csoportja lép reakcióba a cukorkomponens -OH csoportjával, miközben egy molekula víz keletkezik. Emellett léteznek C-glikozidok (pl. vitexin, orientin, izovitexin), amelyeknél C-C kötésekkel kapcsolódik a cukormolekula az aglikon alapvázra [35,36].



3. ábra. A flavonoidok csoportjainak szerkezeti jellemzői példavegyületekkel [Int. hiv. 2.]

II.4.1.2. Fenolsavak

A fenolsavak aromás karbonsavak, amelyek természetes módon fordulnak elő a növényvilágban. Szerkezetileg egy aromás fenolgyűrűt (C6) és legalább egy szerves karbonsav funkciós csoportot (C1) tartalmaznak. Szénvázuk alapján a fenolsavak tovább oszthatóak benzooesav-származékokra, amelyeket egy C6-C1-es váz, illetve fahéjsav-származékokra, amelyeket pedig egy C6-C3-as alapváz jellemez [37]. Míg a fahéjsav-származékoknak a természetben főként észterei fordulnak elő, addig a benzooesav-származékok éppúgy előfordulnak szabad formában, mint észterekkel és glikozidokkal együtt. A fenolsavak a sikimisav útvonalon keresztül aromás aminosavakból (fenilalanin, tirozin) keletkeznek. A fenolgyűrűhöz való -OH csoport kapcsolódásával alakulnak ki a hidroxifahéjsavak és a hidroxibenzooesavak, amelyek tovább csoportosíthatóak az -OH csoportok száma és pozíciója alapján (4. ábra). A legjellegzetesebb hidroxifahéjsav-származékok a kávéssav, a kumársav, a ferulasav, a klorogénsav és a szinapinsav, míg a legáltalánosabb hidroxibenzooesav-származékok a dihidroxibenzooesav, a vanilinsav, a galluszsav, az ellágsav és a sziringinsav [32].



Hidroxibenzooesavak	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
p-hidroxi benzooesav	-OH	-H	-H	-H
Vanilinsav	-OH	-H	-OCH ₃	-H
Galluszsav	-OH	-OH	-OH	-H
Sziringinsav	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-H

Hidroxifahéjsavak	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
p-kumársav	-OH	-H	-H	-H	-H
Kávéssav	-OH	-OH	-H	-H	-H
Szinapinsav	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H
Ferulasav	-OH	-OCH ₃	-H	-H	-H

4. ábra. A fenolsavak csoportjainak szerkezeti jellemzői példavegyületekkel [38]

II.5. Növényi komponensek biológiai hatása a sebgyógyulásban

II.5.1. Gyulladáscsökkentő hatás

A gyulladás az érrendszer komplex biológiai válasza káros ingerekre, mint például kórokozók, kémiai irritáló anyagok vagy sérült sejtek/szövetek. A gyulladásos válasz magába foglalja az immunsejtek vándorlását a vérerekből, valamint a gyulladásos mediátorok (leukotriének, prosztaglandinok) és ROS-ok felszabadulását a károsodás helyéről az idegen kórokozók kiküszöbölésére, illetve a sérült szövet helyreállításához [37].

A polifenolok gyulladáscsökkentő hatásai között a gyulladást előidéző és szabályozó enzimek, mint a ciklooxygenáz-2 (COX2), a lipoxigenáz, a foszfolipáz A2 és az indukálható nitrogén monoxid (NO) szintáz (iNOS) gátlása említhető, ezáltal csökkentve a gyulladásért felelős prosztaglandinok és leukotriének koncentrációját. Ezenkívül korlátozzák a hisztamin felszabadulását, valamint a protein kinázok, a foszfodiészterázok és a transzkriptáz aktivitását is, ezáltal gátolják a gyulladással transzkripció faktor (NF- κ B) aktivációját [39-42]. Az NF- κ B ugyanis normál körülmények között a citoszolban egy inhibitorhoz kötötten lokalizálódik, azonban gyulladással szignál hatására a gátló fehérje leválik, lehetővé téve az NF- κ B transzlokációját a sejtmagba, ezzel aktiválva további gyulladással citokinek transzkripcióját [43].

A flavonoidok közül a különböző bogyós gyümölcsökből azonosított antocianidineknek (cianidin, delphinidin és petunidin-glikozidok) erős gyulladáscsökkentő hatásuk ismert, ugyanis gátolják az iNOS és a COX2 enzim működését, illetve csökkentik a gyulladással citokinek, mint az interleukin-1 (IL-1 β) és interleukin-6 (IL-6) koncentrációját [44]. Bizonyították, hogy a gyulladással indukáló lipopoliszachariddal (LPS) kezelt makrofág RAW264 sejtvonalban a flavonolok (kvercetin és kempferol), az izoflavonok (genisztein) és a flavonok (apigenin és luteolin) is hasonló, erős iNOS gátló hatást mutattak, míg a flavanolok (katechinek) és flavanonok (naringenin, heszperetin) nem csökkentették a NO termelődést. Továbbá a flavonolok (kvercetin, kempferol és miricetin) szintén gátolják a COX2 enzimet, illetve hatékonyabb lipoxigenáz gátló hatással rendelkeznek, mint a flavonok (apigenin, luteolin). A flavanonok (naringenin) azonban nem befolyásolják ezeknek az enzimeknek a működését [45,46]. Ezenkívül a flavonok (apigenin, luteolin és krizin) csökkentik a szérumban tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α) koncentrációját a foszfodiészteráz gátláson keresztül, *in vivo*. A makrofágokban (*in vitro*) az LPS indukálta TNF- α koncentrációját a flavonokon kívül a flavonolok (kvercetin és miricetin) és antocianidinek (cianidin) is csökkentik [47].

A fenolsavak közül a klorogénsav, kávésav és ellágsav gyulladáscsökkentő hatást mutatott az LPS kezelt makrofág sejtekben, ugyanis nemcsak a NO termelést, hanem a COX2 expresszióját is jelentősen gátolták, valamint csökkentették az IL-6, IL-1 β és TNF α koncentrációját is citotoxikus hatás nélkül [48-50]. A kumársav állatkísérletben képes gátolni a TNF- α expresszióját egy adjuváns által kiváltott patkány ízületi gyulladás modellben [51].

II.5.2. Sejtmigráció és proliferáció serkentése

A sebgyógyulás folyamatának egyik kulcsfontosságú lépése az epitél sejtek vándorlása a sérült területre, amelyet általában a szövet mikro környezetének különböző stimuláló

tényezői szabályoznak [52]. A második fontos lépés, a sejtproliferáció később következik be. A bőrszövetben előforduló leggyakoribb sejttípusok közé tartoznak a fibroblasztok és a keratinociták, amelyek fő funkcióik miatt (előbbinél kötőszövetképzés, kollagéntermelés, utóbbinál az új hegszövet kialakítása) nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a sebgyógyulás folyamata során [53]. Jelenleg a sebgyógyulás kutatása olyan új terápiás szerek azonosítására összpontosít, amelyek kedvezően befolyásolják a fibroblasztok és a keratinociták működését, aktiválását.

Az elmúlt évtizedekben jelentős lépések történtek az extracelluláris jelekre adott sejtes válaszok háttérében álló molekuláris folyamatok megértésében. A jelátvitel ugyanis kiemelten fontos mechanizmus minden szervezet számára, különösen a gyulladásos, neurológiai és érrendszeri betegségek szempontjából. Számos betegségben azonosították a sejttúlélés és a sejthalál kiváltásáért felelős jelátviteli mechanizmusokat [54].

A sebgyógyulásban a legfontosabb stimuláló anyagok a növekedési faktorok, amelyek olyan jelátviteli folyamatokat indukálnak, mint a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád. A MAPK-ok a gyulladás szabályozásával, a sejtek túlélésével és proliferációjával valamint a kollagenáz termelésével járó génexpresszióban szerepet játszó szignál transzdukciós mechanizmusok alapvető részét képezik [55]. Ennek a szignáltranszdukciós kaszkádnak 3 csoportját különböztetjük meg: az extracelluláris szignál által szabályozott kináz 1 és 2 (Erk1/2) vagy más néven p42/p44 MAPK útvonal, a c-Jun N-terminális kináz vagy más néven stressz aktivált protein kináz (JNK vagy SAPK) és a p38 útvonal, amelyek közül az Erk1/2 és a p38 kulcsfontosságú jelátviteli útvonal a sebgyógyulásban. Ezek a szerin/treonin fehérje kinázok a citoplazmatikus és a magi funkciókat is szabályozzák. Az Erk útvonalat döntően mitogén faktorok stimulálják, míg a JNK és p38-at elsősorban stressz indukáló ingerek, pl. az UV fény, a hő sokk, és a proinflammatorikus citokinek aktiválják [56]. A JNK jelátviteli út számos sejtes folyamatot szabályoz, például növekedésszabályozást, transzformációt és programozott sejthalált (apoptózis). Az Erk1/2 útvonal döntő szerepet játszik a sejtvándorlás, a proliferáció, a differenciálódás és a sejtek túlélésének szabályozásában. Általánosan a p38 útvonal szerepet játszik a gyulladás, a sejtciklus, a sejthalál, a fejlődés, a sejt differenciálódás, az öregedés és a tumorképződés szabályozásában is [54]. A p38 útvonal részt vehet a keratinociták, a fibroblasztok és a szem szaruhártya sejtjeinek migrációjában, proliferációjában és túlélésében [57-59]. A flavonoidok közül a heszperetin 100–300 nM koncentrációban alkalmazva jelentősen növeli az Erk 1/2 foszforilációját idegsejtekben [54]. Továbbá a luteolin is aktiválja az Erk 1/2 útvonalat az

idegsejtekben [60]. A fenolsavak közül a galluszsav fokozza a keratinociták és fibroblasztok migrációját, továbbá aktiválja a JNK és Erk 1/2 jelátviteli útvonalat is [61].

A sebgyógyulásban szerepet játszó másik jelátviteli útvonal a foszfatidilinozitol 3 kináz (PI3K/Akt) út, amely az egyik legfontosabb intracelluláris túlélési útvonal. A PI3K út gátlása ugyanis felgyorsítja az apoptózist [57,62]. Továbbá ennek az útvonalnak aktiválása a sejtek polaritásáért felelős mechanizmusokat serkenti, így fokozza a sejtek vándorlási sebességét, beleértve a fibroblasztokat, keratinocitákat és az endotél sejteket is [63,64]. Ezen kívül az endotél sejtek szabályozásával a PI3K/AKT útvonal kulcsszerepet játszik az angiogenezisben is [65]. Irodalmi adatok alapján különböző flavonoidok (heszperetin 100 nM koncentrációban, kempferol 10 μ M koncentrációban) aktiválják idegsejt modellekben a PI3K/Akt útvonalat [66,67]. Egyes antocianidinek (aglikon forma, pl. delfinidin, cianidin, petunidin, pelargonidin), valamint a bogyós gyümölcsök kivonataiból származó antocianinban (glikozidos forma) gazdag frakciók potenciálisan gátolják a sejt vándorlást és az angiogenezist *in vitro* és *in vivo* a PI3K/Akt útvonalon keresztül, amelyek hatással vannak a sejt migráció és az angiogenezis gátlására [65,68]. Kevés és ellentmondásos bizonyíték áll rendelkezésre a fenolsavak sejt vándorlásban és angiogenezisben betöltött szerepéről. *In vitro* vizsgálat során a klorogénsav erősen gátolta az endotél sejtek migrációját, ezáltal a véredényképzést [69]. Egy másik tanulmányban, ahol a HUVEC endotél sejteket vad áfonya fenolsav kivonatával kezelték, amely elsősorban klorogénsavat tartalmazott, jelentősen növekedett a sejtek migrációja a kezeletlen sejtekhez képest. Ezen túlmenően, a fenolsav frakció nemcsak gén-, hanem fehérjeszinten is növelte a sejt vándorlást és a citoskeletális átstrukturálódás szempontjából kritikus markereket [65]. Továbbá a ferulasav is képes indukálni az endotél sejtek migrációját és a véredényképzést [70].

II.5.3. Antioxidáns hatás

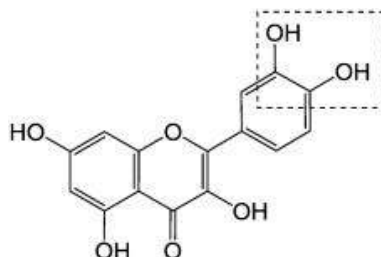
Halliwell és Gutteridge az alábbi antioxidáns definíciót javasolták: „minden olyan anyag, amely késlelteti, megakadályozza vagy eltávolítja a célmolekula oxidatív károsodását”. Ezen vegyületek fiziológiai szerepe – amint ez a meghatározásból is látható – hogy a sejt komponensek szabad gyökökkel történő kémiai reakciói következtében fellépő károsodásokat megakadályozza [28].

A polifenolok többféle mechanizmus révén képesek megelőzni a nem homeosztaticus, megemelkedett szintű szabad gyökök által okozott sérüléseket, amelyek közül a leggyakoribb a ROS-ok közvetlen semlegesítése 1 hidrogén atom átadásával. A flavonoidok ezáltal oxidálódnak, míg a szabad gyökökből stabilabb, kevésbé reaktív vegyületek keletkeznek.

További védelmi mechanizmus az antioxidáns enzimek aktiválása, az oxidáz enzimek gátlása, a kelátképzés vagy a húgysavszint emelkedése [71].

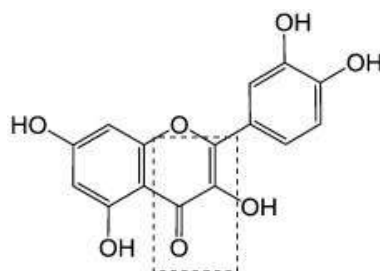
A flavonoidok jól ismert antioxidáns vegyületek, hatásukat elsősorban a hidroxilált csoportok helye határozza meg [71-74]:

- B gyűrű orto-dihidroxi (katechol) struktúrája a 3',4' helyzetben (5. ábra)



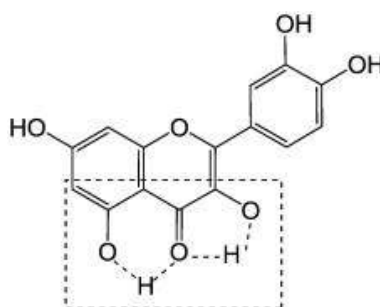
5. ábra. Orto-dihidroxi (katekol) struktúra a B gyűrűn [73]

- 2,3-kettős kötés 4-oxo-funkcióval konjugálva a C gyűrűben, amely biztosítja az elektron delokalizációját a B gyűrűből (6. ábra)



6. ábra. 2,3-kettős kötés 4-oxo-funkcióval konjugálva a C gyűrűben [73]

- 3' és 5' helyzetben lévő hidroxilcsoportok hidrogénkötést biztosítanak az oxocsoporthoz (7. ábra)



7. ábra. Hidroxilcsoportok a 3' és 5' helyzetben [73]

A polimerizált flavonoidok (polimer katechinek, illetve a proantocianidinek vagy más néven kondenzált tanninok) a nagyobb számú hidroxilcsoportjaik miatt magasabb *in vitro* antioxidáns hatással rendelkeznek, mint a monomer vegyületek [71]. Továbbá a flavonoidok

glikozilálása csökkenti azok *in vitro* antioxidáns aktivitását a megfelelő aglikonokhoz viszonyítva [72,75]. A szerkezetüknek köszönhetően az antocianidineknek alacsonyabb a stabilitása az antocianinokhoz képest, aminek következtében az antocianidinek rendkívül reaktívvá válnak [76]. Az antocianidinek acilezése egy vagy több fenolsavval jelentősen megnöveli az antioxidáns aktivitást [77,78], de a glikozilálás az aktivitás csökkenéséhez vezet [76,79]. Ali és munkatársai szerkezet-aktivitás kapcsolat tanulmányozásával kimutatták, hogy antocianinok és antocianidinek gyöksemlegesítő képességét főleg a B gyűrűn lévő hidroxil- és metilcsoportok csoportok száma és helyzete határozza meg [80]. Így ha az antioxidáns hatást a B gyűrű szerkezetének struktúrája alapján nézzük, annak is az R1 és R2 helyzetben lévő szubsztituensei alapján, akkor $-OH > -OCH_3 \gg -H$ csoport szerinti csökkenést, vagyis ennek megfelelő delfinidin > petunidin > malvidin > cianidin > peonidin > pelargonidin antioxidáns csökkenést feltételezünk [81-83].

Csepregi és munkatársai 11 fenolsavnak (5 féle hidroxibenzoesav-származék és 6 féle hidroxifahéjsav-származék) vizsgálták az antioxidáns tulajdonságait, amely során leírták, hogy sem az oldallánc szerkezete (legyen az benzoésav vagy fahéjsav-származék), sem a karbonsavcsoport nem volt hatással a teljes antioxidáns kapacitás (TAC) értékekre. Viszont 3' helyzetben az -OH csoportok jelenléte befolyásolta az antioxidáns hatást (2,3-dihidroxibenzoesav, galluszsav, kávéssav, kaftársav) [72].

Egy másik lehetséges és gyakori mechanizmus az antioxidáns enzimekkel való kölcsönhatás, például a szuperoxid-diszmutáz (SOD), amely eltávolítja a szuperoxidot; a glutation-peroxidáz (GPx), amely a hidrogén-peroxidot vízzé és kevésbé káros hidroxidokká alakítja; valamint a kataláz (CAT), amely szintén a hidrogén-peroxidot képes lebontani [84]. A flavonoidok antioxidáns enzimeken keresztül is kifejthetik sejtvédő hatásukat. Martin és munkatársai humán májsejteket vizsgálva írták le a kakaóban található flavonoidok sejt túlélésért felelős enzimekre (Akt és Erk1/2), valamint antioxidáns enzimekre (glutacion-reduktáz (GR) és GPx) kifejtett serkentő hatását [85]. Továbbá *in vivo* kutatásokban is vizsgálták, hogy a flavonoidokban gazdag táplálkozás jelentősen megemelte patkány vörösvértestekben az antioxidáns enzimek (SOD, CAT, GPx) aktivitását [86]. Azonban ellentmondásokkal is találkozhatunk az irodalomban, ugyanis egyes kutatások szerint a flavonok (krizin), az izoflavonok (genisztein) és a flavonolok (kvercetin) is szignifikánsan csökkentették a vörösvértestekben lévő GR, CAT és GPx aktivitását, míg a SOD enzimet csak a genisztein gátolta [71]. A fenolsavak közül a galluszsav, a ferulasav és a p-kumársav állatkísérletekben szignifikánsan növelte a SOD, GPx és a CAT aktivitását [84].

II.5.4. Antimikrobás hatás

Az antimikrobás anyagok elpusztítják a kórokozókat vagy lassítják a baktériumok és/vagy gombák szaporodását anélkül, hogy károsítanák a környező sejteket, szöveteket. A polifenolokat a növények mikrobiális fertőzés hatására is szintetizálhatják, ezért nem meglepő, hogy számos flavonoidot és fenolsavat találtak hatékonynak a mikroorganizmusok ellen [87].

A fenolos vegyületek antibakteriális aktivitásának mechanizmusai még nem teljesen feltártak, ugyanis többféle úton fejthetik ki hatásukat. A leggyakoribb gátló célpont a bakteriális sejtfal és sejthártya. Általános megfigyelés, hogy a Gram-pozitív baktériumok fogékonyabbak a polifenolok és egyéb antibakteriális anyagok gátló hatásaira, mint a Gram-negatívak, ami az eltérő sejtfal-szerkezettel magyarázható. Ugyanis a Gram-pozitív baktériumok a vastagabb peptidoglikán-réteg ellenére a külső membrán hiánya miatt érzékenyebbek a sejtfalat megcélzó antibiotikumokkal szemben, mint a Gram-negatívak. Ezért a sejthártya áteresztőképességének módosításával, valamint a különböző molekuláris kölcsönhatások miatt a sejtfal épsége megszűnik [87]. Mindezek a módosítások a citoplazmatikus membrán visszafordíthatatlan károsodását és a sejttartalom koagulációját idézhetik elő. Például a kondenzált tanninok a sejtmembrán károsodását okozhatják, sőt enzimekhez kötődve béníthatják az anyagcserét. Ugyanakkor a fenolsavak a membrán integritását megzavarva az intracelluláris alkotóelemek kiáramlását okozzák [88]. Az antocianinok a sejt deformációját és a sejtfal törését okozhatják, jelentős mennyiségű citoplazmatikus anyag és membrán törmelék sejtéből történő kijuttatásával [89]. Egy másik lehetséges gátló útvonal a mikrobák szintetikus aktivitásának változtatása, ezáltal befolyásolva a kulcsfontosságú fehérjék és a DNS szintézisét. Például a katechinek hatékonyak a *Vibrio cholerae* ellen, ugyanis inaktiválják a kolera toxint, továbbá *Streptococcus* és *Shigella* fajok ellen is védenek, mivel gátolják a poliszacharidokat termelő glikozil-transzferázokat. A kvercetin és apigenin a DNS szintézis gátlása révén (DNS giráz gátlók) fejtik ki hatásukat *Escherichia coli* ellen [90]. Összehasonlítva a flavonoid-aglikonok és glikozidok aktivitását, a glikozidok alacsonyabb aktivitást mutatnak, mint az aglikonok [91]. Elsősorban a B gyűrű hidroxiláltsága határozza meg az antimikrobás hatást, így a flavonok közül a luteolin, a flavanonok közül az eriodiktiol, a flavonolok közül a miricetin, az antocianidinek közül a delfinidin és a flavanolok közül az epikatechinek nyújtanak hatékony védelmet mikroorganizmusok ellen [92]. Ezenkívül a flavanonok aktívabbak, mint a flavonok. Például a narigenin antibakteriális hatást mutatott az *E. coli* és *S. aureus* ellen is, míg az apigenin szinte semmilyen hatással nem rendelkezett. Ez az eredmény azt jelezheti, hogy a C2

= C3 kettős kötés telítettsége növelte az antibakteriális aktivitást [91]. Továbbá a három -OH csoporttal rendelkező pirogallolgyűrű magasabb antimikrobás hatást mutat, mint a kettő -OH csoporttal rendelkező katecholgyűrű [91,93]. A fenolsavak esetében a megnövekedett gyűrűs hidroxil- és/vagy metilcsoportok száma általánosan csökkenti azok antimikrobás tulajdonságait [94,95].

II.6. Az általunk vizsgált gyógynövények általános előfordulása, morfológiai, fitokémiai és népgyógyászati jellemzői

II.6.1. Réti nyúlszapuka (*Anthyllis vulneraria* L.)

Az *Anthyllis vulneraria* (*A. vulneraria*, 8. ábra) a kétszikűek (Magnoliopsida) osztályának hüvelyesek (Fabales) rendjébe, ezen belül a pillangósvirágúak (Fabaceae vagy Leguminosae) családjába tartozik [96].

A nyúlszapuka szinte egész Európában előfordul, elsősorban meszes talajokon, száraz réteken és legelőkön él [97]. 15-30 cm magasra növő, évelő növény egyenes szárral és karógyökérrel. Hosszú nyelű, egyszerű tőlevelei a virágzás idejére nagyrészt eltűnnek. A virágok sárgás színűek, 1-2 cm-es pillangós pártájúak és tömött fejcskében ülnek [98].

A nyúlszapuka földfeletti virágos-leveles hajtásából flavonoidokat (kempferol, kvercetin, izoramnetin, ramnetin, fizetin, geraldol), szaponinokat [99] és tanninokat mutattak ki [100].

Az erdélyi népgyógyászatban a földfeletti leveles-virágos hajtást főként gyulladások, sebek kezelésére használják külsőleg, borogatásként [101,102]. Teája hányáscsillapítóként [103] és vizelethajtó szerként is ismert, továbbá vese- és hólyagproblémák, valamint cukorbetegség kezelésére is alkalmas [104]. Kalotaszegen takarmánynövényként is használják [105].



8. ábra. *Anthyllis vulneraria* (fotó: Papp N., Lövete, 2008)

II.6.2. Télálló fukszia (*Fuchsia magellanica* Lam.) és korallfukszia (*Fuchsia triphylla* L.)

A *Fuchsia magellanica* (*F. magellanica*, 9. ábra) és *Fuchsia triphylla* (*F. triphylla*, 9. ábra) a kétszikűek (Magnoliopsida) osztályának mirtuszvirágúak (Myrtales) rendjébe, ezen belül a ligetszépefélék (Onagraceae) családjába tartoznak [96]. Főként az Egyenlítő mentén honosak, azonban Európában is előfordulnak [97]. Peruban a kínafa keresése közben találtak rá a mutatós, lecsüngő virágú növényekre a XVII. században. Ezek a fajok elsősorban díszes virágzatuknak köszönhetően már korán eljutottak Európába: 1696-ban kerültek Peruból Párizsba, ahol főleg botanikus kertekben terjedtek el. Az angol kertészek csupán 1799-től kezdték termesztani. Németországba 1830 után került, mint dísznövény. A napjainkban kedvelt fuksziák elsősorban hibridek. A fukszia fajok a magyar nyelvben „függőke” néven is ismertek lecsüngő virágjaik miatt [106].

A fajok legfőbb ismertetőjegyei a hosszú kocsányon lecsüngő, két- vagy többszínű virágok, amelyek vacokrésze skarlátvörös, tölcséres. A csészelevél vörös színű, 4 visszahajló tagból áll, míg a szíromlevél kékes-ibolya vagy fehér színű [105].

Nagy mennyiségű antocianinok jelenlétét mutatták ki fukszia fajok virágjában és bogyótermésében egyaránt [107-109], míg a lomblevelek jelentős mennyiségben tartalmaznak flavonoidokat, elsősorban flavonolokat (kvercetin, kempferol) és flavonokat (apigenin, luteolin) [110,111].

Az erdélyi népgyógyászatban a fuksziák friss leveleit elsősorban sebekre használják [105], továbbá kelések, bőrgyulladások kezelésére is alkalmazzák nyersen, borogatásként [112].



9. ábra. *Fuchsia magellanica* (bal) és *Fuchsia triphylla* (jobb)
(fotó: Csepregi R., PTE Botanikus Kert, 2016)

II.6.3. Pénzlevelű lizinka (*Lysimachia nummularia* L.)

A *Lysimachia nummularia* (*L. nummularia*, 10. ábra) a valódi kétszikűek (Rosopsida) osztályának kankalinvirágúak (Primulales) rendjébe, ezen belül a gyantafafélék (Myrsinaceae) családjába tartozó faj [96]. Korábban a lizinkát a kankalinfélék (Primulaceae) családjába sorolták [97,113], azonban Borhidi az elvégzett filogenetikai analízis alapján indokolta a módosítást.

A pénzlevelű lizinka egész Európában elterjedt, főként árokpartokon, vízpartokon, nedves talajú legelőkön és réteken fordul elő [97]. 15-50 cm hosszú, évelő növény. Kúszónövénynek számít, ugyanis talajjal érintkezve a szárcsomóknál legyökerezik. Sűrűbb állomány esetén felemelkedhetnek a hajtások. A szár felülete lehet sima, de előfordulhat, hogy enyhén szőrözött [114-116]. A levelek tojásdad vagy kerekded-szíves alakúak, érmékhez hasonlítanak, innen ered a „pénzlevelű” elnevezés [106,113].

Korábbi fitokémiai vizsgálatok alapján a növény elsősorban flavonoidokat, fenolsavakat, benzokinonokat, szaponinokat és tanninokat tartalmaz [117,118]. Továbbá Podolak és munkatársai egy triterpén szaponint (nummularozid) is izoláltak a növény földalatti részéből [119].

Az erdélyi népi gyógyászatban a növény földfeletti hajtását külsőleg és belsőleg egyaránt használják: belsőleg főzetként fogfájás csillapítására [101], míg külsőleg borogatásként reumás panaszok enyhítésére [120,121], valamint különféle bőrbetegségek, sebek és tályogok kezelésére alkalmazzák [20,102,105]. Fürdővízbe is teszik forrázatként, ugyanis ülőfürdőként ebben a formában is alkalmas a reumatikus fájdalmak csillapítására [112].



10. ábra. *Lysimachia nummularia* (fotó: Papp N., EGSC-Melius Gyógynövénykert, 2019)

II.7. A sebgyógyulás háttérében álló folyamatok *in vitro* metodikai vizsgálata

II.7.1. A sebgyógyulás *in vitro* modellezése

Számos *in vitro* és *in vivo* módszer áll rendelkezésre az új terápiás szerek sebgyógyulásra, azon belül is sejt migrációra ható jellegének szűréséhez. A sebgyógyulás modell *in vitro* vizsgálatára mind a mai napig a legismertebb és egyben legelfogadottabb módszer az ún. scratch assay, ahol a monolayer sejt kultúrán sebzést (karcolást) ejtenek és monitorozzák a sejtek inváziós képességét a megkarcolt felületen. Az olcsó és jól megalapozott modell segíti az új terápiás szerek sebgyógyító hatékonyságának kezdeti megértését. Mivel ez a technika nem biztosítja a standard karcolási szélességet, ezért a magas szórás értékek elkerülése érdekében vizsgálatainkhoz gyárilag is beszerezhető, meghatározott (500 μm) vastagságú steril betéteket használtunk, amelyek segítségével a monolayer sejt kultúrákban standard szélességű sejtmentes területet hoztunk létre [122].

II.7.2. A növényi kivonatok citotoxicitás/dózis-hatás méréseinek lehetőségei

A sejt életképességet (viabilitást) és citotoxicitást mérő tesztek gyakran alkalmazzák *in vitro* toxikológiai modellekben növényi hatóanyagok vagy egyéb komponensek előszűrésére, ugyanis egy általános, átfogó képet adnak az élő és halott/károsodott sejtek arányáról [123]. Ezeket a módszereket az onkológiai kutatásokban is használják arra a célra, hogy felmérjék mind a vegyület toxicitását mind a tumorsejt növekedésének gátlását a gyógyszerfejlesztés során. Továbbá széles körű elterjedésük oka, hogy ezek a technikák gyorsak, olcsók, nem igénylik a kísérleti állatok alkalmazását, továbbá a humán sejt kultúrákon végzett tesztek megismételhetőbb eredményt adnak, mint az állatokon végzett kutatások. Ezenkívül nagyszámú minta tesztelésére is felhasználhatók, lemezolvasó készülékek birtokában automatizálhatók [124].

A viabilitás és citotoxicitás vizsgálatok többféle alapelv szerint működhetnek. Elterjedtek a klasszikus festékkizárásos technikák (tripánkék, propidium jodid, Sytox green), amelyek lehetnek mikroszkópiai megfigyelések, lemezolvasóra vagy áramlási citometriára adaptált módszerek. Bizonyos fluoreszcens sejt mag festékek (Hoechst, DAPI), amelyek kis molekulatömegű lipofil vegyületek, képesek átjutni az intakt, ép sejtmembránon is. Más festékek viszont (propidium-jodid, Sytox green) hidrofíl karakterűek, ezért már csak a sérült sejthártyán jutnak át. A kromatint ily módon megfestve nyomon követhetővé válnak a morfológiai változások, így a DNS fragmentáció is. Az apoptózis kezdeti szakaszában a sejtmembrán még nem átjárható a festékek számára, ezzel szemben a nekrotikus sejtek

propidium-jodiddal (PI) vagy Sytox green-nel már a nekrozis kezdetén is festődnek, így a módszer alkalmas arra, hogy elkülönítsük az apoptotikus és nekrotikus sejteket [125-128].

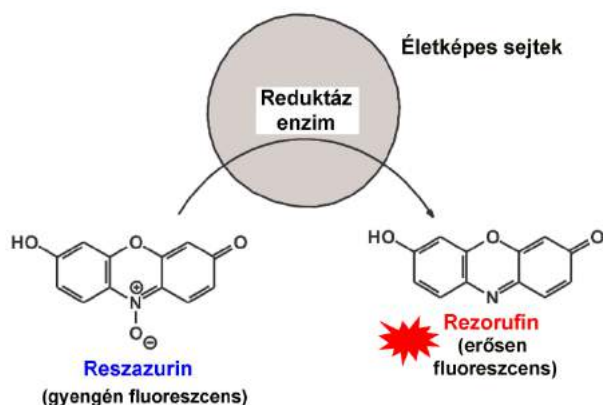
Áramlási citometria segítségével különbséget lehet tenni korai és késői apoptotikus sejtek között. Ugyanis az apoptózis kezdeti szakaszában, még a DNS fragmentáció előtt, membrán foszfolipid (foszfatidil-szerin) transzlokáció történik a membrán külső felszínére, így az ehhez kötődő fluoreszcens festékkel (pl. fluoreszcein izotiocianát-FITC) jelölt annexin molekulák segítségével kimutatható a korai apoptózis. Azonban a módszer nem minden esetben tekinthető teljesen specifikusnak, hiszen nekrotikus sejtekből is kijuthat foszfatidil szerin a citolízis eredményeként [129,130].

A sejtes életképesség mérésének egy másik jelentős megközelítése a metabolikus paramétereket magába foglaló módszerek alkalmazása, amelyek lehetnek kolorimetriás, fluoreszcens, illetve biolumineszcens alapú detektáló módszerek, amelyeket főleg lemezolvasóra adaptáltak [126,131].

A sejtek az energiát az adenzin-trifoszfát (ATP) molekulák kémiai kötéseiben tárolják, amelyek különböző anyagcsere útvonalak végtermékei, illetve számos biológiai folyamathoz (fehérje szintézis, jelátvitel, transzkripció aktivitás stb.) nélkülözhetetlenek [132]. Emiatt a lumineszcencia alapú intracelluláris ATP szintek meghatározását széles körben alkalmazzák a sejtek életképességének a meghatározáshoz, amely a legpontosabb és legérzékenyebb lemezolvasó alapú módszerek közé tartozik [126,133]. Azonban hangsúlyozni kell, hogy az ATP ciklus nagyon gyors [134], emiatt a különböző kezelések nagyon hamar befolyásolhatják (növelik vagy csökkentik) az ATP koncentrációját, jelentős sejtszámbeli változás bekövetkezése nélkül [126,135].

A rezazurin vagy más néven Alamar Blue teszt a reduktáz enzimek általi redukción alapuló életképesség vizsgálat szintén egy széles körben elterjedt módszer, mivel erős korreláció figyelhető meg a rezazurin redukciója és az élő sejtszám között, mind az állati mind a bakteriális sejtek esetében [136-138]. A rezazurin nevű festék (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) önmagában gyenge fluoreszcens aktivitással rendelkezik, azonban az élő sejtekben lévő reduktáz enzimek hatására egy erősen fluoreszcens anyag, a rezorufin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one) keletkezik (11. ábra) [139]. Azonban önmagában, egyetlen paraméterként a rezazurin sem felel meg, mivel interferencia alakulhat ki a tesztvegyület (főleg tiol- vagy karbonsavcsoportot tartalmazó anyag) és a keletkező fluoreszcens rezorufin között [140]. Továbbá az optimális gyárilag javasolt inkubálási időt túllépve, ami az adott sejtípus metabolikus aktivitásától függően 1-4 óra közötti időtartam,

toxikus hatású is lehet, amely érdekes módon erőteljesebb tumoros sejtvonalban, mint normál sejtek esetén [141,142].



11. ábra. A rezazurin és a rezorufin kémiai szerkezete [143]

Népszerűek a fehérjeméréseken alapuló életképesség tesztek, ugyanis az ismert koncentrációjú standard fehérjeoldatok kalibrációs görbéjének elkészítése után könnyen kiszámítható az ismeretlen minta fehérjetartalma. A módszerek közül számos kolorimetriás és fluoreszcens módszer áll rendelkezésre. A legnépszerűbb, leggyorsabb és legkönnyebben összeállítható kolorimetriás teszt a Bradford módszer. Alapja, hogy a fehérjék bázikus aminosavai, legfőképpen az arginin, a Coomassie G-250 festékhez kötődve annak elnyelési maximumának 470 nm-ről 595 nm-re történő eltolódását eredményezi. A módszer előnye az érzékenységében is rejlik, ugyanis 1-20 µg fehérjemennyiség is kimutatható [144]. Egy újabb, fehérjetartalmat mérő technika a bikinolinil-dikarbonsav (BCA) teszt, amely a fehérjékben található peptidkötések nitrogénjének azon képességét méri, hogy mennyire redukálja lúgos közegben a Cu^{2+} ionokat Cu^+ ionokká, miközben ibolyás színű komplex keletkezik, amelynek mennyisége arányos a peptidkötések számával. A színes komplexek elnyelése fotometriásan 570 nm-en mérhető. Mérési tartománya 15–2000 µg/ml között van [145]. Léteznek továbbá fluoreszcencia derivatizáláson alapuló fehérjemérő módszerek pl. a fluoreszkamin alapú mérés. Az önmagában nem fluoreszcens tulajdonságú fluoreszkamin vagy más néven fluram, a fehérjék szabad primer amino-csoportjaihoz kötődve erősen fluoreszkáló vegyületet képez, amely reakció szobahőmérsékleten, pillanatszerűen, alkalikus pH-n megy végbe (pH = 9,2 a legideálisabb). A módszer rendkívül érzékeny, már 1 µg/ml fehérjekoncentráció is pontosan meghatározható [146,147]. Azonban fontos megjegyezni, hogy nincs tökéletes fehérjemeghatározási eljárás. A Bradford teszt bár nagyon érzékeny, 1 µg fehérje kimutatására is alkalmas, hátránya, hogy a mérést a mintához adott detergens megzavarhatja, azonban kis mennyiségben alkalmazott detergens (0,1% alatti koncentrációban) jelenléte már

nem hamisítja meg az eredményt [148-150]. A fluoreszkamin alapú fehérjemérő módszer pedig érzékenysége ellenére erősen pH függő, ugyanis savas pH esetén a fluoreszcencia-intenzitások csökkenését figyelték meg [147]. További korlátozó tényező a fehérjetartalom mérésénél, hogy nincs megfelelő komplex standard, amely jól tükrözi a sejtek összetett fehérjetartalmát.

A viabilitás mérése *in vitro* igen nehéz és bonyolult feladat, ugyanis a kapott eredményeket kellő óvatossággal kell értelmezni. Mindegyik módszernek van előnye és hátránya, ezeket mérlegelve kell választani közülük, illetve többet is, ha lehetséges. A legfontosabb szempontok közé tartozik a módszerek kiválasztásánál az adott teszt érzékenysége, a pontosság, a mérést zavaró anyagok jelenléte és a mérésre szánt idő.

II.7.3. A növényi kivonatok nem enzimatis, teljes antioxidáns kapacitásának (TAC) mérési lehetőségei

A teljes antioxidáns kapacitás (TAC) magában foglalja a komplex biológiai mintában (plazma, testnedvek, növényi kivonat) található összes antioxidáns vegyület kumulatív hatását, így integrált paramétert biztosít, nem pedig a mérhető antioxidánsok egyszerű összegét. Ezáltal felmérhetjük az ismert és ismeretlen antioxidánsok kapacitását és azok szinergikus kölcsönhatását, így betekintést nyerhetünk az oxidánsok és az antioxidánsok közötti finom egyensúlyba [151]. A TAC-ról nem szabad egyetlen antioxidáns tesztmodell alapján következtetéseket levonni. Emiatt a kutatók a gyakorlatban számos *in vitro* vizsgálati eljárást alkalmaznak az antioxidáns aktivitások értékelésére a kérdéses mintákban. Az általánosan elismert *in vitro* TAC módszerek többsége szabad gyökök semlegesítésén alapulnak. Azonban a módszerekhez különböző gyökvegyületet alkalmaznak, ezért nehéz összehasonlítani a különböző rendszerekben kapott eredményeket [152]. Emellett az irodalomban módszerenként eltérő kalibrálószer is alkalmaznak pl. aszkorbinsav, galluszsav vagy trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-kromán-2-karboxil sav, vízoldékony E vitamin analóg), amely szintén megnehezíti a kapott eredmények irodalmi forrásokkal történő összevetését.

Az antioxidánsok a szabad gyökökkel különböző mechanizmusok szerint reagálnak, ami alapján két csoportot különböztetünk meg: hidrogénatom átvitelén alapuló (hydrogen atom transfer - HAT) vagy egy elektronátmeneten alapuló (single electron transfer - SET) módszereket. A HAT kinetikai mechanizmusaiban az antioxidáns átadja az egyik hidrogén atomját a szabad gyöknek, így maga az antioxidáns gyökké válik [152-154]. A SET mechanizmusokban az antioxidáns redukáló kapacitását mérjük, ahol az antioxidáns elektront

ad át a szabad gyököknek, míg maga kation gyökké válik. Ezek a reakciók többnyire színváltozással járnak [155,156].

II.7.3.1. Az általunk vizsgált hidrogénatom átvitelen (HAT) alapuló módszerek

II.7.3.1.1. Oxigényök Abszorpciós Kapacitás – Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

A módszer alapja, hogy a rendszerben jelenlévő fluoreszcens komponens jelét a szabad gyökök kioltják [157]. A folyamat során a fluoreszkáló riporter molekula peroxil gyökökkel (ROO[•]) reagálva oxidatív károsodást szenved, emiatt a fluorofór (lehet fluoreszcein vagy β -fikoeritrin) által kibocsátott fluoreszcens jel intenzitása lecsökken. A módszerhez használt oxidáns molekula az AAPH (2,2'-azo-bis (2-amidinopropán) dihidroklorid), amelynek termolíziséből peroxil gyökök keletkeznek. Amennyiben antioxidáns vegyületek vannak jelen, az antioxidánsok először az AAPH molekulával reagálnak, így a reakció időben késleltetett lesz, ugyanis minél nagyobb az antioxidáns koncentráció, annál lassabban zajlik a fluoreszcens jel csökkenése [158]. Előnye, hogy kinetikai mérés révén a lassú reakciósebességű antioxidánsok hatása is mérhető, ami különösen hasznos azon növénykivonatoknál, amelyek gyakran több összetevőt tartalmaznak és összetett reakciókinetikával rendelkeznek [158]. Továbbá a módszer hidrofil és lipofil komponensek antioxidáns hatásának meghatározására egyaránt alkalmas a pufferrendszer közeg összetételének megváltoztatásával [159]. Hátránya, hogy viszonylag lassú a kinetikus reakció miatt, valamint pH érzékeny [156].

II.7.3.1.2. Erősített kemilumineszcenciás teszt (ECL)

A módszer szabad gyökök generálásán és kemilumineszcencia indukálásán alapul [160]. A rendszerben lévő gyökgerjesztő molekula a tormaperoxidáz, amely a H₂O₂-t bontja, aminek következtében a próbamolekula pl. a luminol luminolgyökké alakul és az általa emittált kemilumineszcens jel ún. erősítő molekula jelenlétében intenzívebb és hosszabb időtartamú lesz [161]. Amennyiben antioxidáns molekulák vannak jelen, a kemilumineszcens jel kialakulása időben késleltetett lesz. Minél nagyobb az antioxidáns molekulák koncentrációja a rendszerben, annál nagyobb időbeli eltolódás következik be a fényemisszióban. Maga a módszer Muller és munkatársainak a munkáján alapul [162], azonban a rendszert munkacsoportunk módosította, hozzáadva az erősítő komponenst (para-jodofenolt) és optimalizálva a reakciót, ezáltal egy érzékenyebb és stabilabb fénykibocsátású módszert kaptunk. A mérési közeg megváltoztatásával a rendszert az autooxidációtól

szarvasmarha szérum albuminnal védtük. A módszer előnye, hogy gyors, érzékeny és könnyen automatizálható [163]. Továbbá az ORAC eljáráshoz hasonlóan fiziológiai körülmények között is előforduló gyököket használ, így biztonságosabban demonstrálható az antioxidánsok reakcióképessége biológiai rendszerben.

II.7.3.2. Az általunk vizsgált egy elektron átvitelen (SET) alapuló módszerek

II.7.3.2.1. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás mérése

A módszer alapja a gyök semlegesítés hatására bekövetkező színreakció. Az antioxidáns hatású molekulák azon tulajdonságát méri, hogy milyen mértékben képesek redukálni a DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) stabil szabad gyök vegyületet, amely gyök formában sötétlila színű, azonban antioxidánsokkal reagálva elhalványul, sárgás színű vegyületté redukálódik. Minél nagyobb az antioxidáns molekulák koncentrációja a rendszerben, annál sárgább lesz az oldat. Mindezek következménye az abszorpciócsökkenés, amely 517 nm-en spektrofotométeren nyomon követhető [164]. Az *in vitro* vizsgálatok közül a DPPH módszer a legnépszerűbb annak egyszerűsége, gyorsasága és alacsony költségei miatt [165]. Hátránya, hogy DPPH[•] természetes formában nem fordul elő az élő szervezetben, így nem tudhatjuk biztosan, hogy biológiai gyökökkel szemben hogyan reagálnak a minta antioxidánsai. Továbbá a módszer fény-, oldószer-, pH- és oxigénfüggő. Problémát jelent továbbá a gyök hozzáférhetősége, ugyanis a kisebb molekulák könnyebben kapcsolódnak a gyökhöz, ezáltal tévesen nagyobb TAC értéket adnak. Emellett nyilvánvaló, hogy az antioxidánsok és az oxidánsok közötti reakciósebesség különbségek nem tükröződnek a kapott értékekben, mivel a DPPH teszt egy végpont módszer [158,164,166].

II.7.3.2.2. Troloxra vonatkoztatott Antioxidáns Kapacitás – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

A módszer alapja az ABTS^{•+} kationgyök (2,2'-azino- di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfoninsav) semlegesítése [167,168]. A reakció kiindulási pontja, hogy a szintetikus ABTS-ből ABTS^{•+} kation gyök keletkezik kálium-peroxo-diszulfát (K₂S₂O₈) segítségével. Ebben a reakcióban az ABTS^{•+} csökkenését mérjük, amelyet színreakció változás kísér. Az oldat színe elhalványul vagy elveszti színét a mintában levő antioxidánsok miatt. A reakció spektrofotometriásan nyomon követhető 734 nm-en. A módszer előnye, hogy költséghatékony, nem pH-függő, valamint az alkalmazott hullámhosszon a természetes növényi eredetű színanyagok nem okoznak interferenciát. A módszer lipofil vagy hidrofil

jellegű antioxidáns vegyületek tesztelésére is alkalmazható [156,167]. Általánosságban elmondható, hogy az erősen pigmentált és hidrofil antioxidánsok jobban értékelhetők az antioxidáns aktivitás szempontjából a TEAC teszt használatával a DPPH módszerhez képest [169]. Hátránya, hogy hosszú időt vesz igénybe a mintaelőkészítés miatt, mivel a mérés előtt 12 órás elő-inkubálás szükséges az ABTS^{•+} kialakulásához, amely a normál anyagcsere során nem keletkezik az élő szervezetben, így nem tudhatjuk biztosan, hogy a biológiai gyökökkel szemben mennyire reaktívak a minta antioxidánsai. Továbbá gondot okozhat, hogy az előállított szabad gyök csak rövid ideig stabil, valamint nem standardizált, ezért nehéz összehasonlítani az egyes laboratóriumokban kapott eredményeket. Végül a DPPH módszerhez hasonlóan, a reakciósebesség különbségek az antioxidáns és oxidáns molekula között nem tükröződnek, mivel az végpontmérésen alapul [156,166,170].

II.7.4. Az intracelluláris ROS és antioxidáns kapacitás mérése

A kémiai, nem enzimatisz antioxidáns vizsgálatok eredményei nem képesek teljes mértékben tükrözni a minta antioxidáns tulajdonságát *in vivo*. Ezért meg kell becsülni az antioxidánsok hatékonyságát biológiailag releváns feltételek mellett is. Az állatmodellek és az emberi vizsgálatok a legalkalmasabbak értékelésre, de drágák és időigényesek [171]. Ezért vizsgálati módszerként sejtalapú antioxidáns aktivitás vizsgálatot fejlesztettek ki az antioxidáns kapacitás értékelésére [172].

A leggyakrabban alkalmazott módszer a sejten belüli ROS kimutatására, ezáltal az antioxidáns kapacitás mérésére egy fluoreszcein származék, a 2',7'-diklór-fluoreszcein (DCFH). Az acetylált formája (2',7'-diklór-fluoreszcein-diacetát - DCFH-DA) egy sejtmembrán, apoláris vegyület, amely a sejtmembránon keresztül képes bejutni a sejtekbe. Az élő sejtekben lévő észterázok lehasítják a diacetát csoportot, ezáltal felszabadítva a DCF redukált állapotát (DCF-H₂), amely ezután intracelluláris ROS vegyületekkel reagálva egy fluoreszcens vegyületté oxidálódik. Antioxidánsok jelenlétében a fluoreszcens jel alacsonyabb lesz, amely lemezolvasón kinetikus méréssel nyomon követhető [173].

A dihidrorodamin 123 (DHR123) is egy sejtmembrán, nem toxikus, apoláris vegyület, amely bejutva a sejtekbe ROS vegyületek hatására fluoreszcens vegyületté oxidálódik a mitokondriumban. Azonban antioxidánsok jelenlétében a fluoreszcencia intenzitása csökken, amely fluorimetrián, kinetikus módban lemezolvasón nyomon követhető [174]. Mindkét festék hátránya, hogy érzékeny a fotooxidációra és a kémiai környezetre, emiatt megfelelő munkakörülményeket kell használni: gyenge fényviszonyok mellett állandó környezeti hőmérsékletet. Továbbá a DCFH és a DHR is általános ROS

kimutatásra alkalmas festék, ugyanis a H_2O_2 , a $\cdot\text{O}_2^-$, a nitrogén-dioxid gyök ($\text{NO}_2\cdot$), a HOCl , valamint az $\text{OH}\cdot$ is egyaránt képesek oxidálni a vegyületeket. Továbbá az eredmények az inkubációs időintervallumon alapulnak, ezért optimalizálni kell azokat az egyes sejttípusokhoz és a különböző kezelési körülményekhez [173,175,176].

II.7.5. Antimikrobás vizsgálatok: minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása

A dilúciós technika az egyik leggyakrabban alkalmazott antimikrobás vizsgálómódszerek közé tartozik. A minta mennyiségétől függően megkülönböztetünk makro- és mikrodilúciós technikákat. A makrodilúciós technika esetén a vizsgálat csövekben történik, míg mikrodilúciós vizsgálat esetén 96 lyukú lemezekben. A kísérlet során a vizsgálandó mintát folyékony táptalajban hígítják, majd az alapoldatból általában hígítási sorozatot készítenek. Minden csőhöz a megfelelő csíraszámra beállított baktériumtenyészet azonos mennyiségét adják, majd homogenizálják és inkubálják a csövek tartalmát. A mikrobiológiai aktivitást lemezolvasón történő optikai denzitás (OD) mérése alapján határozzák meg, valamint vizuális úton, agar táptalajra való kioltással. Mindkét esetben az antimikrobás hatás meghatározása növekedési kontrollhoz viszonyítva történik, amely csak a baktériumtenyészetet tartalmazza. A módszer lehetőséget nyújt az antimikrobás hatás jellemzésére szolgáló MIC (minimális gátló koncentráció) meghatározására. A MIC_{80} érték megmutatja, hogy a vizsgált mintának mekkora az a legkisebb koncentrációja, amely a baktérium szaporodását a kontroll tenyészetéhez viszonyítva 80%-ban gátolja [177-179].

II.8. A ciklodextrinek, mint „gazdamolekulák” (mikrokapszulázás)

A ciklodextrinek (CD-ek) gyakran alkalmazott segédanyagok az élelmiszer-, kozmetikai- és gyógyszeriparban, mivel apoláros molekulákkal ún. „gazda-vendég” típusú zárványkomplexekeket alakítanak ki (ezt mikrokapszulázásnak is nevezik): A CD-ek alkalmasak arra, hogy apoláros vegyületeket vizes oldatba vigyenek és/vagy javítsák a vendégmolekula fizikokémiai stabilitását [180-182]. Továbbá a fluorofór molekulák CD-komplexei általában erősebb fluoreszcenciát mutatnak, mint a fluorofór önmagában [183,184]. A CD-ek számos lipofil vegyülettel képesek kölcsönhatásba lépni, a natív CD-ek kémiai módosításával a CD-ek vendégmolekula iránti szelektivitása, valamint a képződő komplexek stabilitása növelhető [183]. Jellemző szerkezeti sajátosságuk az apoláros belső üreg, míg külső részük hidrofil, ami lehetővé teszi a lipofil molekulák vagy molekularészek akár tartósabb csapdázását is [185]. Ezáltal egyes erősen lipofil anyagok (pl. illóolajok) is vizes oldatba vihetők a CD technológia felhasználásával [178].

III. CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozatban az alábbi 2 fő célkitűzés alapján végeztük vizsgálatainkat.

III.1. Citotoxicitást mérő új metodika kidolgozása valamint az elérhető tesztek megbízhatóságának tesztelése

A sejtes citotoxicitás mérések során az irodalomban gyakran csak egy viabilitásparamétert vizsgálnak egy toxikus ágens, vagy egy növényi minta hatásának a megismeréséhez. Azonban kutatócsoportunk korábbi eredményei igazolták, hogy az életképességről kapott adatokat egy paraméter alapján nem lehet kielégítően értékelni, mivel nem biztos, hogy az egy ATP-függő folyamathoz kapcsolódik, ezáltal nem feltétlenül az életképességet tükrözi, hanem a sejtek számát (például kalcein észter jelölés esetén) [126]. Mivel a választott növényi mintákat sejtes modellekben terveztük vizsgálni, amelyek első lépése mindig a dózis-hatás vizsgálat, emiatt nélkülözhetetlen volt egy megbízható citotoxicitást mérő módszer kidolgozása.

Mindezek alapján PhD kutatásaim elején a következő központi kérdésekre kerestük a választ:

- Kidolgozható-e olyan többparaméteres citotoxicitás teszt, amely lehetővé teszi ugyanazon sejtes mintából egy lépéses feltárással több különböző intracelluláris jellemző meghatározását?
- Mivel a fehérjeszintézis ATP-függő folyamat, alkalmazható-e zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) expresszáló sejtvonalakban a GFP fluoreszcencia kvantitatív mérése a viabilitás megítéléséhez?
- Milyen korlátozó tényezők merülhetnek fel egy citotoxicitást mérő módszer beállításánál? Vannak-e olyan vegyületek, amelyek képesek beavatkozni egy életképességet, vagy citotoxicitást mérő módszerbe?

III.2. A sebgyógyulásban szerepet játszó gyógynövények kémiai és biológiai vizsgálata

Az elmúlt évtizedekben számos növényi, állati és ásványi eredetű gyógyászati készítményt írtak le etnofarmakobotanikai forrásmunkákban, amelyek egy részét már vizsgálták különböző farmakológiai modelleken. Azonban számos növényfaj népgyógyászati és farmakológiai értéke még így is feltáratlan maradt. Ráadásul Erdély népgyógyászati kincse is további feltérképezést igényel. Sajnos napjainkban generációról generációra öröklődő népi orvoslási tudáselemeket és a tradicionális gyakorlatot olyan külső, könnyen elérhető források befolyásolják, mint például elérhető szakkönyvek, internet, napilapok, magazinok és egyéb

médiaforrások, ezért sürgető feladat a hagyományosnak tekinthető adatok gyűjtése, értelmezése és megőrzése még azok elfeledése előtt. A gyógynövényekben található hatóanyagok alapvető forrásai lehetnek a szintetikusán előállított gyógyszereknek. Az IX. Európai Gyógyszerkönyvben felsorolt szintetikus, kémiai összetevők 1-3%-át tüntetik fel sebek és egyéb bőrbetegségek esetén. Ezzel szemben a természetes növényi hatóanyagot tartalmazó gyógyszerek 30%-a bizonyult ezidáig alkalmasnak sebek kezelésére [186].

Mindezek alapján a dolgozat további részében az alábbi célokra és kérdésekre megválaszolására összpontosítottunk:

- Célként tüztük ki népgyógyászati adatok gyűjtését Erdélyben, a Homoród-völgyben élő lakosok tudásáról, különösen a sebek, fekélyek és egyéb bőrbetegségek helyi gyógymódjairól, a korábbi feljegyzések kiegészítéseként. Továbbá eredményeinkkel alátámasztani kívántuk az ezidáig feljegyzett ismereteket, hangsúlyozva bizonyos növényfajok további etnofarmakológiai vizsgálatának szükségességét. Ezenkívül arra is törekedtünk, hogy a kijelölt fajok esetében új adatokat találjunk további vizsgálatok tervezéséhez.
- Célunk volt olyan növényfajok kijelölése, amelyek esetén bőrbetegségekre, sebekre történő alkalmazásuk ellenére kevés irodalmi adat áll rendelkezésre fitokémiai tulajdonságaikról és biológiai hatásmechanizmusaikról.
- Kémiai vizsgálataink fő kérdése volt, hogy kvantitatív és kvalitatív adatokat nyerhetünk-e a tesztelt növények hatóanyagtartalmára vonatkozóan?
- Biológiai vizsgálataink során több kérdésre is választ kerestünk:
 - Mely dózisban használhatóak a tesztelt növényi kivonatok sejtes vizsgálatokban, amelyek már nem okoznak életképesség csökkenést, de feltételezhetően fokozzák a sejtek migrációs és proliferációs képességét?
 - Van-e és milyen mértékű a kivonatok antimikrobás hatása?
 - Van-e és milyen mértékű a kivonatok antioxidáns hatása?
 - Serkentik-e a kivonatok és milyen mértékben a sejtek migrációs képességét?
 - Megállapítható-e, hogy a növényi kivonatok pontosan mely jelátviteli utak fehérjéinek aktiválásán keresztül érik el hatásaikat?

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV.1. Sejt alapú citotoxicitás mérések

IV.1.1. Sejtek fenntartásához szükséges anyagok

A sejtenyésztéshez használt oldatok, médiumok a következők voltak: magas glükóz tartalmú (4500 mg/l) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), tripszin- etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), penicillin-sztreptomicin antibiotikum keverék, nem esszenciális aminosav (NEAA) oldat (Sigma-Aldrich Kft), valamint főtális szarvasmarha szérum (FBS; Pan-Biotech). A steril munkához Sarstedt szövettenyésztő flaskákat és lemezeket (96 lyukú vagy 6 lyukú) használtunk.

IV.1.2. Sejtkultúrák

Vizsgálatainkat kitapadó **A549-GFP** (ATCC CCL-185; GFP-t expresszáló humán tüdőkarcinóma sejtvonal, forrás: PTE Gyógyszerészi Biotechnológia Intézet), **HepG2** (ATCC: HB-8065; humán hepatoma sejtvonal, forrás: PTE Immunológiai és Biotechnológia Intézet), **HaCaT** (normál humán keratinocita sejtvonal, forrás: Debreceni Egyetem, Immunológiai Intézet) és **3T3** (ATCC: CRL-1658; normál egér embrionális fibroblaszt sejtvonal, forrás: PTE Immunológiai és Biotechnológia Intézet) monolayer sejtkultúrákon végeztük. A sejtek fenntartásához és tenyésztéséhez a magas glükóz tartalmú DMEM médiumot használtuk, kiegészítve 10% FBS-sel, penicillin (100 U/ml) - sztreptomicin (100 µg/ml) antibiotikum keverékkel, illetve a 3T3 sejtek esetében 1% NEAA oldattal. A sejteket standard sejtenyésztési körülmények között (37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó, párasított atmoszférájú termosztátban) tartottuk fenn.

IV.1.3. Többparaméteres citotoxicitás teszt beállítása lemezolvasón

IV.1.3.1. Alkalmazott oldatok és reagensek

A vizsgálatainkhoz használt anyagok: ochratoxin A (OTA), cikloheximid (CHX), propidium jodid (PI), fluoreszkamin (Sigma-Aldrich Kft), gyári CLSII ATP assay Kit és peroxidmentes Triton X-100 (TX-100) (Roche), nátrium-fluorid (NaF) (Acros Organics), marha savóból tisztított albumin (BSA) (Reanal Labor).

Munkánkhoz egy általunk fejlesztett sejtfeltáró (lizáló) oldatot használtunk, amelynek alapja 0,2 M bórsav/NaOH puffer; pH 9,2; ezt 0,1% TX-100 és 20 mM EDTA vegyszerekkel egészítettük ki. Az ATP méréshez használt gyári reagenst házi ATP mérő pufferrel (0,1 M

Trisz/acetát, 2 mM EDTA, 10 mM magnézium-szulfát (MgSO₄), pH 7,75) hígítottuk (Lach-Ner Kft.).

IV.1.3.2. Mérés menete

Az új többparaméteres módszer beállításához a GFP-t expresszáló A549 sejteket 96 lyukú sejttenyésztő lemezekben tenyésztettük. Az 1 éjszakán át tartó előinkubálás után különböző anyagcsere inhibitorokkal kezeltük őket: nátrium-fluoriddal (NaF; 4 órás inkubálást alkalmazva, 2,5; 5; 10; 15 és 20 mM koncentrációkban), cikloheximiddel (CHX; 4 illetve 24 órás kezelést is alkalmazva, 0,02; 0,04; 0,08; 0,18 és 0,35 nM koncentrációkban), valamint ochratoxin A-val (OTA; 24 órás kezelést használtunk, 5; 12,5 és 20 µM koncentrációkban).

A kezelést követően ugyanabból a sejtes mintából ATP, összes nukleinsav és intracelluláris összfehérje meghatározást végeztünk a Perkin-Elmer EnSpire Multimode lemezolvasón az alábbi módon: az adott ideig tartó kezelések után a sejteket háromszor mostuk 200 µl kalcium- és magnézium tartalmú foszfát pufferolt sóoldatban (PBS; pH 7,4). Ezt követően 200 µl saját fejlesztésű sejtfeltáró borát pufferrel (pH 9,2) lizáltuk a sejteket. Lyukanként 10 µl feltárt mintát pipettáztunk át fehér 96 lyukú lemezbe (OptiPlate, Perkin Elmer), amelyhez 100 µl gyári ATP reagensből az ATP mérő pufferrel 10-szeresére hígított oldatot adtunk. Az ATP mennyiségi meghatározásához gyári ATP standardból készített hígítási sor lineáris kalibrációs egyenesét használtunk. Ezt követően a sejtszám becsléséhez a feltárt sejtes mintát 2 µg/ml koncentrációjú PI-dal jelöltük. Az 5 perces inkubálást követően $\lambda_{exc.}=530$ nm; $\lambda_{em.}=620$ nm hullámhosszokon mértük a fluoreszcencia intenzitásokat. Ezután a sejtekből GFP-tartalmat mértünk $\lambda_{exc.}=480$ nm; $\lambda_{em.}=520$ nm hullámhosszokon. Végül az intracelluláris összfehérje meghatározáshoz 20 µl lizált sejtes mintát pipettáztunk át egy új 96 lyukú lemezbe, amelyhez 150 µl házi sejtfeltáró puffert, majd 50 µl fluoreszkamin oldatot (6 mg/20 ml acetonban oldva) adtunk. Egy rövid rázatást követően $\lambda_{exc.}=385$ nm; $\lambda_{em.}=490$ nm hullámhosszokon mértük a fluoreszcencia jeleket. Az eredményeket %-ban fejeztük ki a kontroll (nem kezelt) csoportokhoz viszonyítva. A vizsgálatokat 4 független kísérletben, 16 párhuzamos méréssel végeztük el (n=4x16). Az eredmények a kezelt és a kontroll sejtek fluoreszcencia intenzitásának %-ban megadott összehasonlításából származnak (átlag ± szórás) [150].

IV.1.4. β -ciklodextrinek hatása a rezazurin fluoreszcenciás életképességi tesztre

Kísérleteink során háromféle béta-CD kölcsönhatását vizsgáltuk meg rezazurinnal és rezorufinnal: natív béta-ciklodextrin (BCD), hidroxipropil-béta-ciklodextrin (HPBCD), valamint heptakis-2,6-di-*O*-metil-béta-ciklodextrin (DIMEB). A molekuláris kölcsönhatások vizsgálatát vizes közegben (PBS, pH 7,4) végeztük, a CD-ek hatását a rezazurin életképességi tesztre humán májkarcinóma (HepG2) sejtvonalon teszteltük és hasonlítottuk össze sejten belüli teljes ATP és fehérje tartalom meghatározásával.

IV.1.4.1. Alkalmazott vegyszerek és oldatok

A mérésekhez használt összes reagens spektroszkópai vagy analitikai minőségű volt: rezazurin és rezorufin (Sigma-Aldrich Kft), natív béta-ciklodextrinek (BCD), beleértve a HPBCD-t (szubsztitúció foka = 4,5) és DIMEB-et (szubsztitúció foka = 14) (CycloLab Kft, Budapest), PBS, (pH 7,4) (Thermo Fisher Scientific).

A sejtes életképesség mérésekhez gyári Bioluminescent ATP Assay CLSII Kit-et (Roche), kálium-hidroxidot (KOH) és nátrium-hidroxidot (NaOH) (Reanal Labor) használtunk. Az ATP méréshez használt házi puffert a IV.1.3.1. alfejezetben ismerttettem. Az intracelluláris teljes fehérje meghatározásához házi készítésű Bradford-reagenst [126,143] használtunk. Az optikai méréseket Sarstedt normál és Perkin Elmer fehér (OptiPlate) 96 lyukú lemezekon végeztük.

IV.1.4.2. A ciklodextrinek molekuláris kölcsönhatásainak mérése fluoreszcencia spektroszkópiával

A rezorufin-CD kölcsönhatásokat fluoreszcencia spektroszkópai (Hitachi F-4500 fluoriméter) módszerrel vizsgáltuk, ami során az emissziós spektrumokat 25 és 37°C-on vettük föl ($\lambda_{\text{ex}} = 570$ nm). A CD-eket (BCD, HPBCD, DIMEB) emelkedő koncentrációban (0-1200 μM) adtuk hozzá 0,4 μM rezorufinhoz PBS-ben (pH 7.4).

A CD-komplexek stabilitását a Benesi-Hildebrand egyenlet grafikus alkalmazásával határoztuk meg, 1:1 arányú sztöchiometriát feltételezve:

$$\frac{I_0}{(I - I_0)} = \frac{1}{A} + \frac{1}{A * K * [CD]^n}$$

ahol K a kötési állandó (L/mol), I_0 a rezorufin fluoreszcencia emissziós intenzitása ($\lambda_{\text{em}} = 583$ nm) CD-ek nélkül, I a rezorufin fluoreszcencia emissziós intenzitása ($\lambda_{\text{em}} = 583$ nm) CD-ek jelenlétében, $[CD]$ a ciklodextrinek moláris koncentrációja (mol/L), A egy konstans, n pedig a kötőhelyek száma.

IV.1.4.3. A CD-ek hatása a sejtes citotoxicitás mérésekre

A CD-ek esetleges zavaró hatását HepG2 sejtvonalon vizsgáltuk reszazurin teszt, valamint ATP- és intracelluláris összfehérje tartalom meghatározással 96 lyukú sejttenyésztő lemezekben. A sejteket 0; 0,25; 0,5 és 1 mM CD koncentrációkkal, továbbá 2 μ M reszazurinnal együtt és külön is kezeltük 30 és 120 percig. A kezelések után lemezolvasón (Perkin Elmer EnSpire Multimode reader) mértük a minták emissziós jelét ($\lambda_{\text{ex}} = 570$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm).

Az ATP- és a teljes sejten belüli fehérjemeghatározást munkacsoportunk korábbi munkája alapján végeztük el [126]. A sejteket a CD kezelések (30, illetve 120 perc) után, reszazurinnal való inkubálás nélkül mértük le a lemezolvasón. 200 μ l kalcium- és magnézium tartalmú PBS-ben történő háromszori mosást követően 250 μ l 5%-os perklórsavat adtunk a mintákhoz. 15 perc inkubálás után 150 μ l perklórsavas kivonatokat pipettáztunk át egy új 96 lyukú lemezbe, amelyhez 100 μ l 9,13% KOH-t adtunk. A kicsapódott K-perklorátot 15 percig ülepítettük, majd a felülúszókból 10 μ l mintát pipettáztunk fehér 96 lyukú lemezbe (OptiPlate). Ezután a lyukakba 100 μ l gyári ATP reagens pufferrel 10-szeresére hígított oldatát adtuk. A biolumineszcenciás jelet a Perkin Elmer lemezolvasón mértük, ATP standard sort is alkalmazva (17-546 nM). Végül az intracelluláris fehérje meghatározásához a perklórsavval fixált sejtek fehérjéit 250 μ l 1 M NaOH-val szolubilizáltuk. Újabb normál lemezben 20 μ l lúgos extraktum és 200 μ l Bradford reagens elegyítése után abszorbancia mérést végeztünk 595 nm-en. A fehérje mérésekhez BSA standard sort használtunk (20-100 mg/l). A vizsgálatokat 5 független kísérletben végeztük el, 8 párhuzamos mintát alkalmazva ($n=5 \times 8$). Az eredmények a kezelt és a kontroll (kezeletlen) sejtek jel-intenzitásának %-ban megadott összehasonlításából származnak (átlag \pm szórás) [143].

IV.2. Erdélyi népgyógyászati adatok alapján kijelölt növényi kivonatok vizsgálata

IV.2.1. Etnobotanikai kutatás Erdélyben

A népi orvoslási adatok gyűjtése során a Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar (PTE GYTK) Etnofarmakobotanikai Kutatócsoport munkájába kapcsolódtam be Székelyföldön, Hargita megyében. Felmérések történtek Abásfalva, Bágy, Gyepes, Homoródkarácsonyfalva, Homoródkeményfalva, Homoródremete, Homoródszentmárton, Homoródszentpál, Homoródszentpéter, Kénos, Lókod, Lövéte, Recsenyéd és Városfalva településeken (2016-2019), amelyek között Városfalván a terepmunkában személyesen is részt vettem (2019). A kijelölt településeken az orvosi, az állatorvosi és a gyógyszertári ellátás csak részben biztosított (1. táblázat), így a

népgyógyászati tudáselemek napjainkban is kiemelkedő szerepűek a helyiek körében. A lakosság zömében mezőgazdasággal és állattartással foglalkozik a jelzett falvakban, mellette a méhészet és tejtermékek forgalmazása is jellemző.

Az adatközlők felkeresése során több szempontot is figyelembe vettünk. Elsősorban olyan személyeket kerestünk fel, akik betöltötték legalább az 50. életévüket, szem előtt tartva a foglalkozást, végzettséget és az életkörülményeket. Az adatközlőkkel félig strukturált interjúkat készítettünk, amelyek során betegcsoportok szerint említettek gyógynövényfajokat, helyenként állati és egyéb anyagokat is. A növényfajokkal kapcsolatban az alábbi adatok feljegyzésére került sor: népi elnevezés, élőhely, gyűjtési idő, hely és mód, gyűjtött növényi rész, szárítás és tárolás módja, készítménytípus, helyi alkalmazás és a kezelt betegségek. A gyűjtött adatokat diktafonnal és kézi jegyzetekkel rögzítettük. A hangfelvétel minden esetben az adatközlők előzetes beleegyezésével történt, az *International Society of Ethnobiology* által előírt etikai szabályok alapján [Int. hiv. 3. ISE 2007]. A növényfajokat fényképfelvételek segítségével dokumentáltuk.

1. táblázat. *Kijelölt települések Székelyföldön*

Kutatópontok	Adatközlők/ Lakosság	Orvosi ellátás	Állatorvosi ellátás	Gyógyszertári ellátás
Abásfalva	15/362	-	-	-
Bágy	19/197	-	-	-
Gyepes	8/134	-	-	-
Homoródkarácsonyfalva	23/450	-	-	-
Homoródkeményfalva	14/209	-	-	-
Homoródremete	8/52	-	-	-
Homoródszentmárton	21/570	+	+	+
Homoródszentpál	15/494	-	-	-
Homoródszentpéter	12/120	-	-	-
Kénos	18/143	-	-	-
Lókod	10/83	-	-	-
Lövete	85/2900	-	+	+
Recsenyéd	20/136	-	-	-
Városfalva	28/240	-	-	-

IV.2.2. A vizsgált növényfajok gyűjtése és kivonatok készítése

IV.2.2.1. Növénygyűjtés menete

Az előzőekben ismertetett etnobotanikai felmérések adatait szakirodalmi forrásokkal és adatbázisok eredményeivel vetettük össze, amelyek alapján olyan potenciális fajokat

választottunk további vizsgálatainkhoz, amelyekről nem, vagy csak kevés fitokémiai és farmakológiai adat áll jelenleg rendelkezésre. Ezek alapján jelöltük ki az értekezés Bevezetésében ismertetett *Anthyllis vulneraria* L., *Fuchsia magellanica* Lam., *Fuchsia triphylla* L. és *Lysimachia nummularia* L. taxonokat további vizsgálatainkhoz.

A növények azon drogészeit gyűjtöttük, amelyek az adatközlők elmondása szerint a népi gyógyászatban alkalmazásra kerülnek. A mintákat egyedi kódokkal jelölve a PTE GYTK Farmakognóziai Intézetének növény szárító helyiségében szobahőmérsékleten szárítottuk, majd papírzacskóban tároltuk a kivonatok készítéséig. A földfeletti virágos-leveles hajtást gyűjtöttük az *Anthyllis vulneraria* (Pécs, Tettye, mészkő sziklagyep, 2016. július, TR_7) valamint a *Lysimachia nummularia* (Erdély, Homoród-mente, nedves rét, 2016. július, TR_15) esetében. A PTE Botanikus kertjében található *Fuchsia magellanica* (TR_10) és *Fuchsia triphylla* (TR_9) fajokból lomblevelet gyűjtöttünk (2016. július).

IV.2.2.2. Alkalmazott oldatok

A kivonatokhoz 96% (v/v) európai gyógyszerkönyv (Ph. Eur) minőségű etanolt (Reanal Labor Kft) tridesztillált vízzel hígítottunk.

IV.2.2.3. Kivonatok készítése

A szárított, majd aprított növényi mintákból a terepmunkánk során a népgyógyászatban említett felhasználásuk alapján 50%-os etanos (népgyógyászatban pálinka, vodka, vagy egyéb alkohol volt az oldószer) és vizes kivonatok készítettünk Lee és munkatársai munkája alapján [187]: 3 g mintához 30 ml 50%-os (v/v) etanolt vagy tridesztillált vizet adtunk, majd a kivonatok szobahőmérsékleten, rázógépen (Bühler KL2) egy éjszakán át rázattuk (200 fordulat/perc). Ezt követően a kivonatok Whatman típusú szűrőpapíron gömblombikokba szűrtük, majd rotációs vákuum bepárló készülék (Büchi Rotavapor R-3) segítségével bepárltuk. A bepárlást követően a korábban lemerített üres gömblombikok tömegeinek levonása után 0,4-0,5 g száraz tömeget kaptunk vissza minden minta esetében, amelyet 5 ml 50%-os (v/v) etanolban vagy tridesztillált vízben oldottunk fel. Így 80.000-100.000 µg/ml végkoncentrációjú törzsoldatokat kaptunk. Az etanos és vizes kivonatok készítését is 3 külön alkalommal végeztük el a 4 növényi minta esetében, majd azokat elegyítve (3x5 ml = 15 ml minden növényi kivonat esetében) ezt követően pedig 500 µl-ként szétporciózva -20°C-on tároltuk a felhasználásig.

IV.2.3. Polifenol analízis nagynyomású folyadékkromatográf (HPLC) diódasoros detektorral és elektropray ionizációval kapcsolt MS készülékkel

IV.2.3.1. Alkalmazott oldatok

A vizsgálatokhoz HPLC szupergradiens minőségű ecetsavat és metanolt (Sigma-Aldrich Kft) használtunk.

IV.2.3.2. Analízis

A fitokémiai vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar Farmakognózia Intézetével együttműködve végeztük. A mérések diódasoros detektorral (DAD) felszerelt Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies) rendszeren történtek. A műszer felépítését tekintve a diódasoros detektoron kívül egy bináris gradiens szivattyúból, egy gáztalanító készülékből, egy oszlop termosztátból és egy automatikus mintaadagolóból állt. A mérések során Zorbax SB-C18, 150 mm hosszú, 3 mm belső átmérőjű, 3,5 µm részecske átmérőjű kolonnát (Agilent Technologies) alkalmaztunk. Az oszlop termosztát hőmérsékletét 25°C-ra állítottuk be. Mozgófázisként A: 0,3% ecetsav oldatot (v/v) és B: metanolt használtuk. Az optimalizált rendszer gradiens programja a következő volt: 0 és 30 perc között a B oldat 5%-ról 100%-ra emelkedés, majd 5 percig fenntartás 100%-on, ezután 1 perc alatt 100%-ról 5%-ra csökkenés. A mobil fázis lineáris áramlási sebessége 0,3 ml/perc, míg az injektálás térfogata 5 µl volt. A detektálás hullámhosszát 280 nm-re állítottuk be.

A kivonatok összetevőinek megbízható minőségi azonosítása érdekében a HPLC mérésekhez tömegspektrometriás (MS) analízist kapcsoltunk. Így az Agilent 1100 HPLC rendszerhez Agilent 6410B hármass kvadrupól tömegspektrométert csatlakoztattunk. Az ionokat elektropray ionizációs (ESI) ionforrás biztosította (Agilent Technologies) negatív (flavonoidok, fenolsavak esetében) és pozitív (antociánok esetében) ionizációs módban. Az alkalmazott ESI feltételek a következők voltak: hőmérséklet: 35°C, porlasztó nyomás: 40 psi, fragmens feszültség: 120 V, kapilláris feszültség: 4000 V. Az ütközési energiát az elemzett struktúrától függően 10 eV és 45 eV között változtattuk. A porlasztáshoz és a molekulák fragmentálásához egyaránt nagy tisztaságú N₂ gázt használtunk, amelynek áramlási sebessége 9 l/perc volt. Az adatgyűjtéshez és az eredmények kvalitatív elemzéséhez MassHunter B.01.03 szoftvert alkalmaztunk. A komponensek azonosításához a retencióidőt, az UV- és tömegspektrumokat, valamint az ide vonatkozó irodalmi adatokat vettük alapul [122].

IV.2.4. A növényi kivonatok citotoxicitásának tesztelése

IV.2.4.1. Alkalmazott oldatok és reagensek

A lemezolvasón végzett vizsgálatainkhoz a *III.4.4.1.* alfejezetben ismertetett reagenseket használtuk.

Az áramlási citometriás mérésekhez felhasznált anyagok a következők voltak: 7-aminoactinomycin D (7AAD; Sigma-Aldrich Kft), Pacific Blue-val (PB) konjugált Annexin V és fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált Annexin V (Thermo Fisher Scientific).

IV.2.4.2. Citotoxicitás mérés lemezolvasóval

A gyógynövény kivonatok (50%-os etanolos és vizes) citotoxikus hatását 3T3 és HaCaT sejtvonalakon teszteltük a *IV.1.3.2.* alfejezetben ismertetett többparaméteres (ATP, nukleinsav, összfehérje) viabilitást mérő módszerünk alapján. Mivel a sejtvonalak nem expresszálnak GFP-t, ezért ezt a paramétert nem mértük. Az alkalmazott kivonatok koncentrációi a következők voltak: *A. vulneraria*: 500-2500 µg/ml (etanolos kivonat) és 4000-8000 µg/ml (vizes kivonat); *F. magellanica* és *F. triphylla*: 50-800 µg/ml (etanolos kivonat) és 120-1000 µg/ml (vizes kivonat); *L. nummularia*: 250-1500 µg/ml (etanolos kivonat) és 3000-7000 µg/ml (vizes kivonat). Etanolos kivonatok esetén maximum 1,5% (v/v) oldószer tartalmú extraktumokat vizsgáltunk, amely koncentráció alatt az etanol már nem befolyásolja a sejtek életképességét. A méréseket 5 független kísérletben, 4 párhuzamos mérést alkalmazva végeztük el (n=5x4). A kapott dózis-hatás görbékre logisztikus illesztést alkalmaztunk OriginLab 2016 program segítségével [122].

IV.2.4.3. Citotoxicitás mérése áramlási citométerrel

Míg a lemezolvasón történő vizsgálatok, még ha több sejtes paramétert mérünk is, csak egy általános képet adnak a növényi kivonatok citotoxikus hatásairól, az élő/halott sejtek arányáról, addig az áramlási citométer nagyobb pontossággal meg tudja határozni a sejten belüli változásokat, különbséget tud tenni az apoptotikus és a nekrotikus sejtek között. Így a műszer érzékenysége miatt azokat a növényi kivonat-koncentrációkat választottuk további tesztelésre, amelyek a lemezolvasón történő méréseknél már nem mutattak jelentős életképesség csökkenést, ezáltal bizonyítva a feltételezett szubtoxikus hatást. Így az *A. vulneraria* esetén 50; 100 és 200 µg/ml koncentrációkat, a *F. magellanica* és *F. triphylla* esetén 2,5; 5 és 10 µg/ml, míg a *L. nummularia* esetén 10; 25 és 50 µg/ml koncentrációkat vizsgáltunk. A HPLC készülékkel (lásd. *III.3.2.* alfejezet) mért magasabb hatóanyag tartalom és így a jelentősebb biológiai hatás miatt csak az etanolos kivonatokot teszteltük.

A kísérleteket BD FACS Canto II áramlási citométeren (Becton Dickinson) végeztük el. A korai és a késői apoptotikus, illetve a nekrotikus sejtek elkülönítése Annexin V és 7AAD festékek segítségével történt. A mérésekhez használt Annexin V FITC-vel vagy PB-vel volt konjugáltatva. Az Annexin V-re pozitív, 7AAD-ra negatív sejtpopuláció jelentette a korai apoptotikus fázist, a 7AAD-re pozitívak, Annexin V-re negatívak a nekrotikus fázist, az Annexin V és 7AAD-re is kettős pozitívak voltak a késői apoptotikus sejtek, míg a kettős negatívak az élő sejtpopulációt jelölték. A méréseket mintánként 10.000 eseményszámmal végeztük el. Mivel 1 sejtes mintán belül kettős fluoreszcens jelölést használtunk, ezért szükség volt a háttér fluoreszcencia meghatározására FMO (fluoreszcencia mínusz egy) kontrollok segítségével, amelyek segítenek meghatározni az adott fluoreszcens jel átfedését. Az FMO kontrollok stratégiájára alkalmazott példa ábra a „Mellékletek” részben található (M1. ábra). A kompenzációt és a kapott adatok elemzését FlowJo v.10 programmal végeztük el. Az eredmények a kezelt és a kontroll (kezeletlen) sejtek fluoreszcencia medián intenzitásának %-ban megadott összehasonlításából származnak (medián) [122].

IV.2.5. Antimikrobás hatás vizsgálata

IV.2.5.1. Vizsgált baktériumtörzsek és alkalmazott oldatok

A kísérleteinkhez használt baktériumtörzseket a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Mikrobiológiai Intézetéből (Szeged Microbial Collection-SZMC kóddal), valamint a Pécsi Tudományegyetem (Pécs Microbial Collection-PMC kóddal) a Természettudományi Kar Mikrobiológiai Intézetéből kaptuk. A vizsgált törzsek a következők voltak: *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*, SZMC 0209), *Escherichia coli* (*E. coli*, PMC 201), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, PMC 29213), *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*, SZMC 0119) és *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, PMC 103). A baktériumtörzseket tripton szója tápoldatban (TSB, Biolab) 30°C-on tenyésztettük a korai stacioner fázisban lévő 10⁵/ml sejtszám elérése céljából.

Vizsgálatainkhoz használt anyagok: 3-N-morfolin-propánszulfonsav (MOPS; Serva), glükóz, adenin (Reanal Labor), módosított Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (165 mM MOPS, 100 mM glükóz és 0,185 mM adenin reagensekkel kiegészítve), eritromicin (Sigma-Aldrich Kft).

IV.2.5.2. MIC₈₀ értékének meghatározása mikrodilúciós módszerrel

A kísérleteket munkacsoportunk korábbi munkája alapján végeztük el [178] kisebb módosításokkal: a mérésekhez használt növényi (50%-os etanolos és vizes) kivonatokat

módosított RPMI 1640 tápoldatban hígítottuk 100 µl végtérfogatban, steril 96 lyukú lemezekben. Az alkalmazott koncentrációk etanolos kivonatok esetén 0,4-3000 µg/ml között, a vizes kivonatok esetén 4-40000 µg/ml között voltak. A hígított kivonatokhoz a mikroorganizmusok szintén módosított RPMI 1640 médiumban előkészített 10^5 /ml sejtszámú szuszpenziójából adtunk 100 µl-t, majd a tenyészeteket 24 órán át 30°C-on inkubáltuk. Az etanolos oldószer végkoncentrációját maximum 1,0% (v/v) értékre korlátoztuk a lyukakban, amely már nem okoz szaporodásgátló hatást és életképességcsökkenést a baktériumokban. A kísérletekhez a kivonatmentes szuszpenziót tekintettük általános baktériumnövekedési kontrollnak, míg pozitív kontrollként eritromicint alkalmaztunk. A fotometriás mérést ($\lambda=580$ nm) követően (Multiskan EX 355 lemezolvasó, Thermo Electron Corporation) megállapítottuk a MIC₈₀ értékeket, ami az a legkisebb kivonat koncentráció, amely 80%-ban megakadályozza az adott mikroorganizmus szaporodását. A szuszpenzió nélküli tápoldat (háttér) optikai denzitás értékét minden esetben kivontuk a kapott eredményből. A vizsgálatokat 5 független mérésben végeztük el, 3 paralelt alkalmazva (n=5x3) [122].

IV.2.6. Nem enzimikus, kémiai antioxidáns kapacitás vizsgálatok

IV.2.6.1. Alkalmazott oldatok és reagensek

Vizsgálatainkhoz használt anyagok: luminol, para-jodofenol, Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilkromán-2-karboxil sav), peroxidáz enzim, Na₂-fluorescein, AAPH, DPPH, K₂S₂O₈, ABTS (Sigma-Aldrich Kft), H₂O₂ (Reanal Labor).

A vizsgálatok során a 4 kijelölt növényfaj 50%-os etanolos és vizes kivonatait vizsgáltuk.

IV.2.6.2. Oxigényök Abszorpciós Kapacitás – ORAC

A mérést munkacsoportunk korábbi munkája alapján végeztük el [163] 96 lyukú lemezekben: 150 µl fluorescein oldatot (400 nM, 75 mM káliumtartalmú foszfát pufferben oldva, pH 7,5) adtunk 25 µl vakhoz/kivonathoz/Troloxhoz, majd 30 percig 37°C-on fénytől védve inkubáltuk. Ezután a mérést 25 µl AAPH (400 mM, 75 mM káliumtartalmú foszfát pufferben oldva, pH 7,5) automatikus injektálása után indítottuk el. A monitorozás BioTek Synergy HT lemezolvasó készüléken ($\lambda_{exc.}=490$ nm; $\lambda_{em.}=520$ nm alkalmazott hullámhosszokon) történt kinetikai módban 80 percig, 2 perces időközönkénti méréssel, 37°C-on.

IV.2.6.3. Erősített kemilumineszcencián alapuló módszer – ECL

A mérést munkacsoportunk korábbi munkája alapján végeztük el [163]. A vizsgálatot BioTek Synergy HT lemezolvasóra adaptálva, fehér 96 lyukú lemezen (OptiPlate) végeztük. Mérés előtt 70 μl detektáló reagenst (0,15 M borát puffer - pH 9,6; kiegészítve 0,45 mM luminollal és 1,8 mM para-jodofenollal) és 200 μl peroxidáz enzimet (15 $\mu\text{U}/\text{ml}$) kevertünk össze, amelyet felhasználásig jégen tartottunk. A mérés sorrendje a következő volt: 20 μl vakhoz/kivonathoz/Troloxhoz 270 μl detektáló reagens+enzim keveréket adtunk, majd a kinetikus mérést (10 perc, 64 másodperces időintervallumban) a lemezolvasóban 20 μl hígított H_2O_2 automatikus injektálásával indítottuk.

IV.2.6.4. DPPH gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás mérése

A módszer Beretta és munkatársainak munkáján alapul, azonban módosítottuk azzal, hogy a DPPH^\bullet koncentrációját megemeltük, 200 μM -os koncentrációt alkalmazva [188]. A mérés menete 96 lyukú lemez esetén a következő volt: 50 μl vakhoz/kivonathoz/Troloxhoz 100 μl DPPH oldatot (200 μM , 96% etanolban oldva) és 50 μl acetát puffert (100 mM, pH 5,5) adtunk. Az abszorbanciát 517 nm-en 60 perc után lemezolvasón (Perkin-Elmer EnSpire Multimode reader) mértük.

IV.2.6.5. Troloxra vonatkoztatott Antioxidáns Kapacitás – TEAC

A módszert Re és munkatársai, valamint Stratil és munkatársai munkája alapján, kisebb módosításokkal végeztük el [167,168]. Az $\text{ABTS}^{\bullet+}$ gyök képzése a következők szerint történt: $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (125 mM) és ABTS (7 mM) 49:1 arányú oldatát 12 órára sötétben, szobahőmérsékleten állni hagytuk. Az $\text{ABTS}^{\bullet+}$ oldat abszorbanciáját $\lambda=734$ nm-en 0,7-re állítottuk a fotometriás mérés lineáris tartományának megtartása céljából. Ezután egy 96 lyukú lemezbe 20 μl hígított növényi mintát (50%-os etanos vagy vizes kivonat) és 80 μl $\text{ABTS}^{\bullet+}$ oldatot adtunk. Az abszorbanciát $\lambda=734$ nm-en 20 perc eltelte után lemezolvasón (Perkin-Elmer EnSpire Multimode reader) mértük.

IV.2.6.6. TAC értékek elemzése

Mind a 4 TAC mérő módszer esetén standardként Troloxból készített hígítási sor kalibrációs egyenesét használtuk, amely a teljes antioxidáns kapacitás mérések széles körben elterjedt kalibrálószerre. A vizsgálatokat 5 független mérésben, 3 párhuzamos mérést alkalmazva végeztük el ($n=5 \times 3$).

Az ORAC és ECL vizsgálatok során az eredményeket Trolox ekvivalensben (TE) adtuk meg (μM). Az ORAC teszt esetén a vakra (csak oldószer) kapott görbe alatti terület (AUC) fluoreszcens jel értékét kivontuk mind önmagából, mind az összes standardból/mintából (nettó AUC). A nettó AUC alapján egy kalibrációs egyenest kaptunk a Trolox standard hígítási sorra. A lumineszcens (ECL) teszt esetében pedig a Trolox hígítási sorára kapott emissziós AUC értékeiből számoltuk ki a kalibrációs egyenest. Ezután mindkét módszernél a növényi minták TE (μM) értékeit a Trolox regressziós egyeneséből számoltuk ki, majd megszoroztuk a hígítási faktoral, végül a kapott értékeket 1 g szárított növényi anyagra vonatkoztattuk. Minél magasabb egy növényi kivonat kapott TAC értéke, annál erősebb az antioxidáns hatása.

A DPPH és TEAC módszerek esetén a növényi kivonatok 50%-os gyöksemlegesítő hatását fejeztük ki (IC_{50}), vagyis azt a koncentrációt adtuk meg $\mu\text{g/ml}$ -ben, amely a DPPH vagy ABTS gyök abszorbanciáját 50%-kal csökkenti. Ezt az adott kivonat koncentrációja és a hozzá tartozó gyöksemlegesítő hatásból (%-ban) kapott lineáris regressziós görbe alapján számoltuk ki. Minél alacsonyabb egy növényi kivonat IC_{50} értéke, annál nagyobb antioxidáns hatással rendelkezik. A gátló százalék kiszámítását az alábbi egyenlet alapján számoltuk ki:

$$\text{Gyök semlegesítő hatás (\% gátlás)} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100$$

Itt az A_0 jelöli a vak (csak oldószer) abszorbanciáját, az A_1 pedig a növényi minta vagy a Trolox standard abszorbanciáját.

IV.2.7. Az intracelluláris antioxidáns kapacitás mérése

IV.2.7.1. Alkalmazott oldatok és reagensek

Vizsgálatainkhoz használt anyagok: 2,2'-azo-bis(2-amidinopropán) dihidroklorid (AAPH), 2',7'-diklórflorescein-diacetát (DCFH-DA) és dihidrorodamin 123 (DHR123) voltak (Sigma-Aldrich Kft). Kezelőoldatként a Hanks' Balanced Salt Solution (Thermo Fisher Scientific) oldatot (5,5 mM glükózzal kiegészítve, Reanal Labor) használtuk, amelyet 4°C -on tároltunk.

A vizsgálatokhoz a 4 kijelölt növényfaj 50%-os etanos és vizes kivonatait is teszteltük. Az intracelluláris reaktív oxigéngyök termelésre gyakorolt antioxidáns hatás megállapításához oxidációra érzékeny DCFH-DA-t és DHR123-t használtuk fel. Oxidálószerként AAPH-t alkalmaztunk, amely segítségével sejten belüli oxidatív stresszt váltottunk ki. A teszteket 3T3 és HaCaT sejtvonalakon végeztük el.

IV.2.7.2. Mérés menete

Az alkalmazott DCFH-DA és DHR123 tesztek 96 lyukú lemezeken (Sarstedt) történtek, amelyek optimális körülményei a következők voltak: 5×10^4 sejt/ml sejtdenzitás, majd 1 éjszakán át tartó elő-inkubálás. Másnap 200 μ l kalcium- és magnéziumtartalmú PBS-ben történő háromszori mosás után a sejteket 5,5 mM glükóz tartalmú Hanks' oldatban oldott 50 μ M DCFH-DA vagy 10 μ M DHR123 és növényi kivonatokkal együtt 37°C-on, 60 percig inkubáltuk. A kezelőoldat eltávolítása után a kinetikai mérés 1 mM AAPH hozzáadása után kezdődött. A fluoreszcencia intenzitásokat 37°C-on, 60 percig monitoroztuk BioTek Synergy HT lemezolvasó készüléken ($\lambda_{exc.}=490$ nm; $\lambda_{em.}=520$ nm hullámhosszokon).

A kivonatok gyöksemlegesítő hatását a gátlás százalékában adtuk meg, vagyis minden növényi kivonatnál azt a koncentrációt határoztuk meg μ g/ml-ben, amely a keletkező diklorofluorescein és rodamin123 fluoreszcencia intenzitását 50%-kal csökkenti. Ehhez a kinetikus mérésből adódóan a vakra (csak oldószer) kapott AUC fluoreszcens jel értékét kivontuk mind önmagából, mind az összes növényi mintából (nettó AUC). Ezután az adott kivonat koncentrációjából és a hozzá tartozó gyöksemlegesítő hatásból (%-ban) kapott lineáris regressziós egyenes alapján számoltuk ki az IC_{50} értékeket.

A gátlási százalék kiszámítását az alábbi egyenlet alapján számoltuk ki:

$$\text{Gök semlegesítő hatás (\% gátlás)} = \left(\frac{AUC_0 - AUC_1}{AUC_0} \right) \times 100$$

Itt az AUC_0 jelöli a vak (csak oldószer) görbe alatti területének, az AUC_1 pedig a növényi minta görbe alatti területének (AUC) fluoreszcens értékét. A méréseket 5 független kísérletben, 4 párhuzamos méréssel végeztük el ($n=5 \times 4$) [122].

IV.2.8. A sejtmigráció („sebgyógyulás teszt”) *in vitro* vizsgálata

IV.2.8.1. Alkalmazott oldatok és reagensek

A migrációs mérésekhez nem az általánosan ismert scratch assay sebzési modellt alkalmaztuk, mivel annak a sebzési szélessége nem standard. Ezért a jobb reprodukálhatóság miatt speciális 500 μ m szélességű steril biokompatibilis szilikon betéteket használtunk (Ibidi GmbH), amelyeket 24 lyukú sejtenyésző lemez (Sarstedt) mélyedéseibe helyeztünk. Pozitív kontrollként vérelemezke eredetű növekedési faktort használtunk (PDGF-BB, Miltenyi Biotec). A vizsgálatokhoz a 4 kijelölt növényfaj 50%-os etanolos kivonatait teszteltük.

IV.2.8.2. Mérés menete

A növényi kivonatokkal kezelt HaCaT és 3T3 sejtek migrációs képességét 500 µm szélességű betétek segítségével vizsgáltuk. A steril inzerteket 24 lyukú sejttenyésztő lemezekbe helyeztük, majd a sejteket az inzertek üregeiben előtenyésztettük. Ezt követően a közel 100% fedettség elérése után eltávolítottuk a betéteket, majd 500 µl kalcium- és magnéziumtartalmú PBS-sel történő egyszeri mosást követően a sejteket a növényi kivonatok szubtoxikus koncentrációival kezeltük, amelyek a következők voltak: *A. vulneraria* esetén 50; 100 és 200 µg/ml, *F. magellanica* és *F. triphylla* esetén 2,5; 5 és 10 µg/ml, *L. nummularia* esetén 10; 25 és 50 µg/ml. Pozitív kontrollként PDGF-BB növekedési faktort használtuk 15 ng/ml koncentrációban. Ezután a sejtek migrációját 4 óránkénti fotó készítésével 24 órán keresztül vizsgáltuk a sejtmentes, kezdetben 500 µm széles területen egy termosztátba helyezhető élő képalkotó technikával rendelkező fáziskontraszt mikroszkóp (JuLi Stage Real-Time Cell History Recorder, NanoEnTek) segítségével. A készüléket 10x-es objektív nagyítással fáziskontraszt módban használtuk.

Az eredmények értékelésénél a sejtmentes terület záródási arányát (a pixel intenzitás %-ában) határoztuk meg ImageJ 1.x program segítségével. A záródási százalék kiszámítását az alábbi egyenlet alapján számoltuk ki:

$$\text{Záródási arány (\%)} = \left(\frac{\text{Sejtmentes terület}_{0,h} - \text{Sejtmentes terület}_{x,h}}{\text{Sejtmentes terület}_{0,h}} \right) \times 100$$

A Sejtmentes terület_{0,h} jelenti a kísérlet kezdetén a 0. időpontban, míg a Sejtmentes terület_{x,h} jelöli az adott időpontban mért sejtmentes terület pixel intenzitását.

Ezután a kapott adatokból minden kivonat esetén összesített záródási görbéket képeztünk és kiszámoltuk a görbe alatti területeket (AUC), vagyis a 0., 4., 8., 12., 16., 20. és a 24. órában kapott %-os értékeket összeadtuk. A végső eredmények a kezelt és a kontroll (kezeletlen) sejtek AUC értékének %-ban megadott összehasonlításából származnak (átlag ± szórás). A méréseket triplikátumban, 3 független kísérletben végeztük el (n=3x3) [122].

IV.2.9. Fehérjeexpressziós vizsgálatok

Az antioxidáns, gyulladáscsökkentő valamint migrációt és proliferációt segítő hatások háttérében álló intracelluláris jelátviteli folyamatokban résztvevő fehérjék vizsgálatát kvantitatív kemilumineszcenciás Western blot módszerrel végeztük.

IV.2.9.1. Alkalmazott oldatok és reagensek

Vizsgálatainkhoz használt anyagaink közül a RIPA puffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,5% nátrium deoxikolát; 1% TX-100%; 1 mM EDTA és 0,1% nátrium-dodecil-szulfát (SDS)), a Tween-20 valamint a fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich Kft), proteáz és foszfatáz inhibitor tabletta (Roche), PBS (pH 7,4) (Thermo Fisher Scientific), tejpor (Bio-Rad) voltak. A Laemmli-puffert (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10 v/v% glicerin; 3 v/v% SDS, 2 v/v% β -merkaptoetanol) és a Tris pufferolt sóoldatot (TBS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) a laboratóriumunkban magunk készítettük el (összetevők: Sigma-Aldrich Kft). A blottoláshoz 0,22 μ m pórusméretű polivinil-difluorid (PVDF; Merck Millopore) membránokat használtunk. A szignálok előhívásához SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate Kit-et használtunk (Thermo Fisher Scientific).

A különböző biológiai funkciókban szerepet játszó fehérjék kimutatására többféle antitestet használtunk a gyártók által javasolt protokoll szerint, amelyet a 2. táblázat foglal magába. Másodlagos antitestként tormaperoxidázzal konjugált (HRP) kecske anti-nyúl IgG (Thermo Fisher Scientific) ellenanyagot 1:4000 hígításban használtunk.

A korábbi méréseink eredményei alapján csak a *F. magellanica* és a *F. triphylla* 50%-os etanolos kivonatait vizsgáltuk HaCat sejtvonalon 2,5; 5 és 10 μ g/ml koncentrációkban.

Az antioxidáns hatás vizsgálatokhoz pozitív kontrollként 10 μ M H₂O₂ oldatot használtunk, míg a gyulladáscsökkentő hatás teszteléséhez 1 μ g/ml LPS oldattal (Sigma-Aldrich Kft) kezeltük a sejteket a növényi kivonatokkal együtt.

2. táblázat. *Western blot vizsgálatokban használt elsődleges ellenanyagok jellemzői*

Antigén specifikáció	Típus	Gyártó	Hígítás
Szuperoxid dizmutáz 2 (SOD2)	Nyúl poliklonális	Fine Test	1: 1 000
Kataláz (CAT)	Nyúl poliklonális	Fine Test	1: 1000
Ciklooxigenáz-2 (COX2)	Nyúl poliklonális	Thermo Fisher	1: 1000
p44/42 MAPK (Erk1/2)	Nyúl poliklonális	Thermo Fisher	1: 500
Foszfo p44/42 MAPK (Thr202, Tyr204)	Nyúl poliklonális	Thermo Fisher	1: 500
Akt	Nyúl poliklonális	Cell Signaling	1: 150
Foszfo-Akt1 (Ser473)	Nyúl monoklonális	Thermo Fisher	1: 1000
p38	Nyúl poliklonális	Fine Test	1: 2000
Foszfo-p38 (Tyr182)	Nyúl poliklonális	Thermo Fisher	1: 150
β -aktin	Nyúl poliklonális	Thermo Fisher	1: 1000
GAPDH	Nyúl poliklonális	Cell Signaling	1: 20.000

IV.2.9.2. Mérés menete

A 24 órás kezelést követően a sejteket jéghideg PBS pufferrel mostuk, majd a 6 lyukú tenyésztőlemezből sejtkaparóval, 1 ml lízis pufferben (RIPA puffer frissen kiegészítve PMSF valamint proteáz és foszfatáz inhibitorokkal) gyűjtöttük össze azokat. Ezután a mintákat 30 percig jégen inkubáltuk, majd 12.000 g-n, 4°C és 10 perc centrifugálás után a felülúszóból Bradford teszt segítségével spektrofotometriásan, 595 nm-en fehérjekoncentrációt mértünk. A lizátumokat 5x töménységű Laemmli-pufferrel (1:4 arány) kiegészítve 5 percig forraltuk denaturálás céljából.

A vizsgálatokhoz 15 μ g denaturált összfehérjét különböző koncentrációjú SDS-t tartalmazó poliakrilamid gélen [189] választottuk el Mini Protean elektroforézis készülékben (Bio-Rad). SOD2, CAT és COX2 antitestek esetén 10% (futtatás: 190 V, 80 perc, 20°C), míg Akt1, foszfo-Akt1 (Ser473), p38, foszfo-p38 (Tyr182), Erk1/2 és foszfo-Erk1/2 (Thr202, Tyr204) esetén 15% (futtatás: 190 V, 4 óra, 4°C) töménységű géleket alkalmaztunk.

Futtatás után a fehérjéket „nedves” immunoblot készülék (Mini Trans-Blot, wet transfer cell, BioRad) segítségével PVDF membránra blottoltuk (40 V, 3 óra, 4°C), aminek a hatékonyságát Coomassie R-250 festékkel (Bio-Rad) állapítottuk meg.

Az aspecifikus kötődés elkerülése végett 1 órán át blokkoltuk a membránokat 5 v/v% tejpor és 0,1 v/v% Tween-20 tartalmú TBS pufferben. Ezt követően a membránokat egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk a megfelelő elsődleges ellenanyagokkal (koncentrációk és hígítások lásd. 2. táblázat). Vizsgálatainkhoz töltési kontrollként β -aktin vagy GAPDH immunjelölést alkalmaztunk, ezzel igazolva, hogy a felvitt fehérjemennyiségek azonosak voltak. Ezután a membránokat 0,05 v/v% Tween-20-t tartalmazó TBS-sel mostuk 5 alkalommal, 10 percig, majd a megfelelő másodlagos ellenanyagot (1:4000 hígításban) adtuk a mintákhoz 1 órára. Az előzőekben is alkalmazott négyszer 10 perc mosás, majd a végén a már csak TBS tartalmú mosást követően, gyári Femto érzékenységgű kemilumineszcens szubsztráttal hívtuk elő a membránokat. A kapott kemilumineszcens jeleket a G:Box Chemi XX6 System (Syngene) készülékkel detektáltuk. A denzitometráást a Syngene GeneTools szoftvere (Synoptics) segítségével végeztük.

IV.2.10. Statisztikai analízis

Adatainkat az SPSS (Statistical Package for the Social Sciences for Windows) statisztikai elemző szoftver 22-es verziójával értékeltük ki (IBM Corporation). A statisztikai értékelés a vizes és az etanolos kivonatok összehasonlításánál független mintás T-próba segítségével történt, míg a kezelt és a kontroll csoportok összehasonlításához az egyutas ANOVA (Dunnett post hoc) tesztet használtuk. A nem sejtes, kémiai antioxidáns vizsgálatok esetén a vizsgált 4 növényfaj etanolos és vizes kivonatainak, valamint az antioxidáns módszerek közötti különbségek vizsgálatához főkomponens analízist (Principal Component Analysis - PCA) végeztünk el, amelyhez az R program (R Core Team, 3.6.1. verzió) procomp funkcióját használtuk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értékeket tekintettük.

V. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

V.1. Sejtalapú citotoxicitás tesztek kidolgozása és megbízhatóságuk vizsgálata

V.1.1. Új, többparaméteres citotoxicitás módszer kidolgozása lemezolvasóra

A lemezolvasóra adaptált vizsgálatokat azok gyorsasága valamint kis mintaigénye miatt széles körben alkalmazzák citotoxicitás teszteknel. A tesztek jelentős hányadában a mérésekhez sejtlízist kell végezni. Számos sejtlízis technika létezik az adott kísérlettől vagy sejttípustól függően, amelyek lehetnek mechanikai, fizikai, kémiai vagy biológiai technikák. Vannak módszerek, amelyek enyhe extrakciós eljárásokat alkalmaznak, például fagyasztás, ozmózis, alacsony hőmérsékleten történő gyors ultrahangos lízis, vagy detergens használata, például SDS vagy TX-100 [190]. Korábbi eljárásunk [126] továbbfejlesztésével sikerült beállítani egy olyan, 1 lépésben történő gyors extrakciós módszert, amely lehetővé teszi ugyanazon sejtes mintából egyidejűleg a sejten belüli fehérje és ATP tartalom mérését valamint a sejtszám meghatározását, ezáltal csökkentve a plusz feltárási időből származó hibák lehetőségét. A kidolgozott új módszer alapja a feltárási oldat, amely egy lúgos pH-val rendelkező bórsav/NaOH puffer (pH 9,2), kiegészítve TX-100-val és EDTA-val. A puffer segítségével egyszerre lizáljuk a kitapadt sejteket, és stabilizáljuk a sejten belüli fehérje és ATP tartalmat akár 30 percig is [135]. Továbbá mindezek segítenek elkerülni az ismételt pipettázásból eredő sejtvesztéséget.

A sejtlizáló puffer optimalizálását követően GFP-n alapuló viabilitási teszttel vizsgáltuk a különböző anyagcsere inhibitorokkal kezelt, GFP-t expresszáló egér tüdő karcinóma sejtvonalat (A549-GFP), hogy van-e összefüggés a GFP fluoreszcencia intenzitása és egyéb, az anyagcserével kapcsolt életképességi paraméterek között. A sejt kultúrákat NaF-dal, OTA-val és CHX-del kezeltük.

A NaF kezeléshez glükózzal kiegészített Hanks oldatot használtunk, hogy tisztább képet kapjunk az intracelluláris anyagcsere változásokról. A Hanks oldatból hiányoznak egyes tápanyagok (például aminosavak), de a médium esszenciális ionokkal és glükózzal van kiegészítve. Ilyen körülmények között a glükóz az egyetlen tápanyag, amelyet a sejtek felvehetnek. Így az eredmény, amelyet a NaF kezelés során látunk, feltételezhetően megmutatja a vegyület hatását a glükóz metabolizmusra, amely a glükózmolekulák hasznosításával függ össze.

Az alkalmazott 4 órás inkubálást követően dózis függően jelentősen lecsökkentek a mért intracelluláris paraméterek. A legdrámaibb eltérés az ATP szintekben volt megfigyelhető, ugyanis a legmagasabb NaF koncentráció (20 mM) szinte teljesen lecsökkentette az ATP

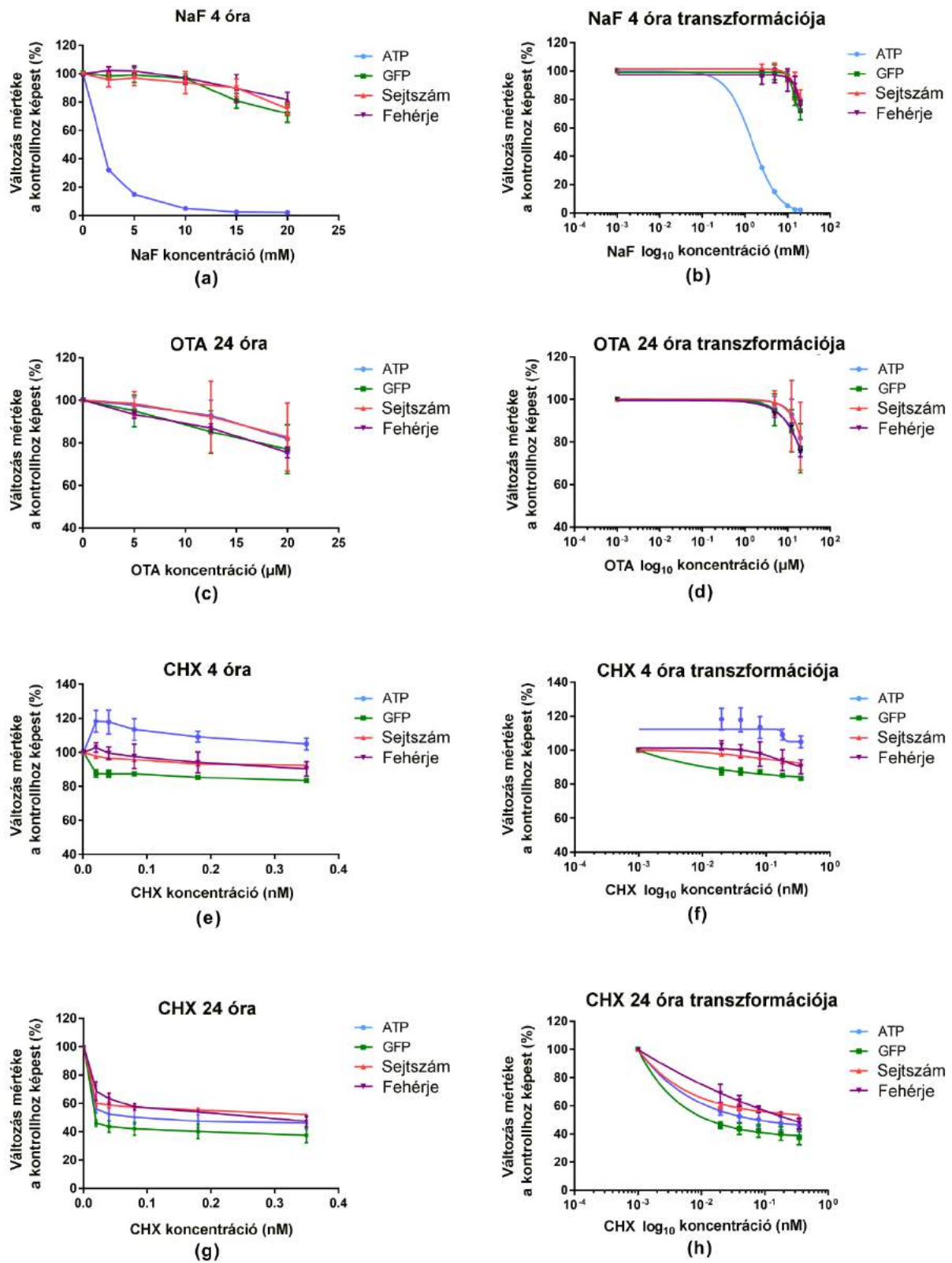
tartalmat (2%-ra), összehasonlítva a kontroll sejtek értékeivel (12. ábra, a és b). Ezek a figyelemreméltó változások nem meglepőek, ugyanis a NaF egy általános, az enzimátikus rendszert gátló vegyület [191]. Ez magába foglalja a glikolitikus enzimek gátlását, amelyek nagyrészt hozzájárulnak az ATP termeléséhez, különösen a tumoros sejtekben, ahol az energia nagyrészt a glikolízistól függ még akkor is, ha az oxigénellátás elegendő és közben az oxidatív foszforiláció is működhet (Warburg effektus) [192,193]. Mindazonáltal figyelemreméltó eredmény, hogy a GFP expresszió (fluoreszcencia) összevetve a sejt számmal (összes nukleinsav tartalom: PI jele) illetve a sejten belüli fehérjetartalommal jó korrelációt mutat (12. ábra, a és b).

Az OTA 24 órás kezelését követően a vizsgált sejten belüli faktorok közül mindegyiknél dóziszfüggő csökkenés figyelhető meg. A legmagasabb OTA koncentráció (20 μ M) 82%-ra csökkentette a GFP szintjét, míg a sejten belüli összes fehérje 75%-ra csökkent le a kontroll 100% értékeihez viszonyítva (12. ábra, c és d). Az OTA a komplex hatását részben az oxidatív stressz indukálásán és az energiadeplíción keresztül közvetíti. Számos toxikus folyamatban vesz részt, például lipidperoxidáció, fehérjeszintézis gátlása, mitokondriális útvonalak gátlása és a DNS direkt károsítása [194,195].

A CHX hatását kétféle inkubálási időben (4 óra, illetve 24 óra után) vizsgáltuk. A rövidebb, 4 órás expozíció esetén nem láttunk változást vagy csak enyhe csökkenést mértünk (12. ábra, e és f), míg a hosszabb inkubálás esetében dóziszfüggő, jelentős választ figyeltünk meg a sejtekben (12. ábra, g és h). A GFP-jel ebben az esetben is erős korrelációt mutat a PI- és fehérjetartalommal. A legerőteljesebb gátlást a vizsgált inhibitorok közül a CHX 24 órás kezelése okozta, ugyanis a GFP szinteket 40%-ra, az összfehérje tartalmat 50%-ra, a PI jelét pedig 60%-ra csökkentette le (12. ábra, g és h). A CHX széles körben alkalmazott vegyület az eukarióták fehérjeszintézisének gátlásához, ugyanis leállítja a transzlációt, annak az elongációs fázisában a riboszómális 60S alegységhez kötve [196]. A 4 órás kezelés megemelte az ATP szintet, míg a 24 órás inkubáció annak jelentős csökkenését okozta. Oka feltehetően a fehérjeszintézis gátlásán keresztüli apoptózis-indukáló hatásának tulajdonítható. Ugyanis az apoptotikus folyamatok energiát igényelnek a downstream folyamatok zökkenőmentes végigvezetéséhez [197,198]. Továbbá a fehérjeszintézis erősen energiafüggő, ezáltal ha a CHX gátolja a fehérjeszintézis útjait, akkor az a fel nem használt ATP felhalmozódását eredményezheti a sejtekben.

Vizsgálatainknál általános megfigyelésként azt tapasztaltuk, hogy kezeléstől függetlenül a GFP-jel intenzitása együtt mozog a sejt számmal és a fehérjetartalommal. Habár a fluoreszcens protein expressziója külső promotor ellenőrzése alatt áll, azonban a

transzkripció és transláció általánosan belső intrinsic faktorok által szabályozott, tehát egyértelműen hatást gyakorol a fluoreszcens fehérje kifejeződésére is.

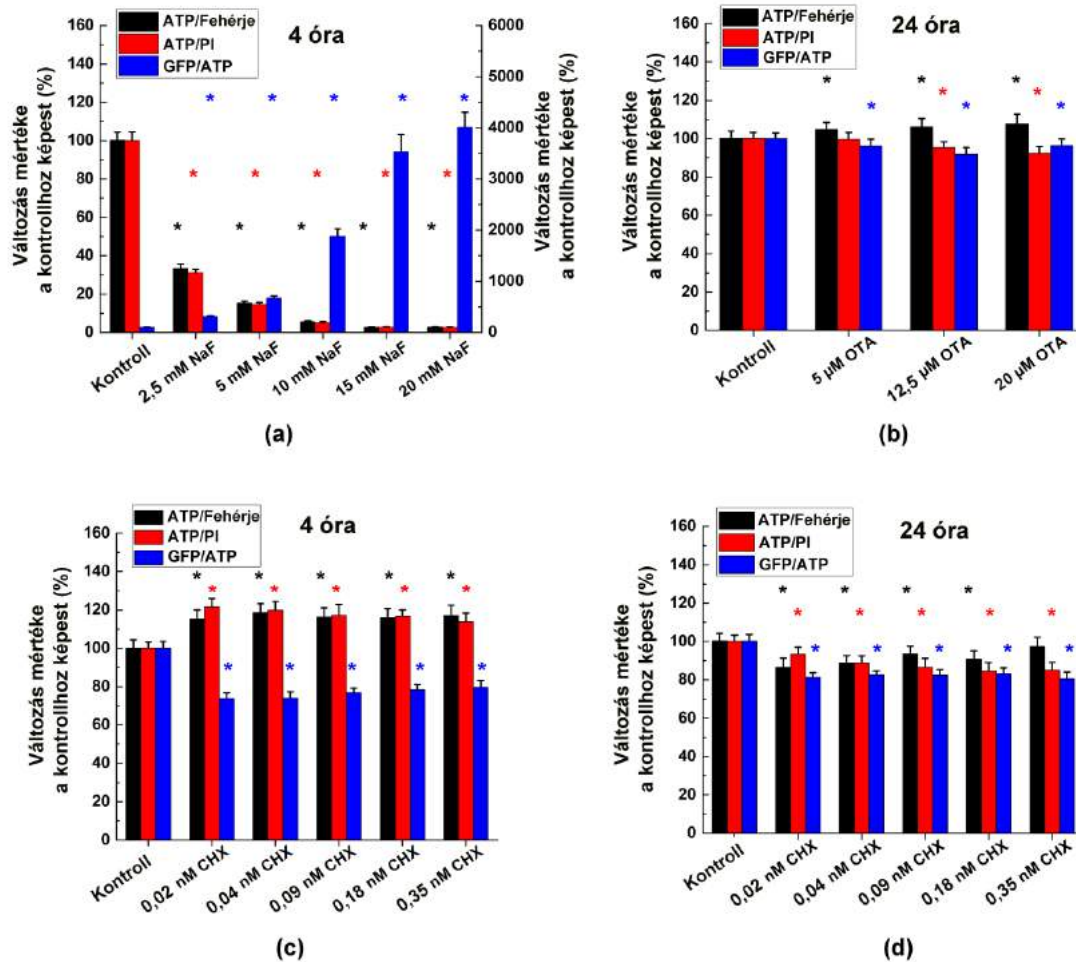


12. ábra. *Dózis-hatás összefüggés vizsgálata GFP-t expresszáló A549 egér tüdőtumor sejtvonalban NaF (a, b), OTA (c, d) és CHX (e, f, g, h) kezelésre. Az expozíció hatását a sejten belüli paraméterekre (GFP, ATP, PI szignálok és teljes fehérjetartalom) abszolút érték formában (a, c, e, g) valamint dózis-válasz görbék formájában (b, d, g, h) ábrázoltuk log₁₀ transzformáció és nem lineáris görbeillesztés után. Az adatokat a kontroll minták %-ában fejeztük ki (átlag ± szórás, 4 független kísérlet, n=4*16 párhuzamos mérés minden koncentráció esetén)[150]*

A vizsgált sejtes paraméterek hányadosainak számolásával az abszolút koncentrációknál érzékenyebb viabilitásbecslést kapunk. Ez különösen akkor nyer nagy jelentőséget, ha gyorsan változó anyagcsere faktort (pl. ATP) szeretnénk vizsgálni. A teljes fehérje- és nukleinsavtartalom lassabban változik, és ezért elsősorban a sejtszámot tükrözi, amely szintén változhat a lemezek lyukaiból történő sérült vagy halott sejtek kimosásának következtében. Így a sejtszámmal arányos paraméterek referenciaként használhatók a hányadosok számításakor. Ezáltal részletesebb információkat kaphatunk arról, hogy a kezelő vegyületek hogyan hatnak a sejtekre, például ha az egyik paraméter csökkenése kevésbé drámai, akkor a hányadosuk jelentősen megemelkedik, viszont ha egyformán változik a 2 paraméter, akkor az arányuk se fog változni. Ha a vizsgált paraméterek arányait nézzük, akkor NaF kezelésnél érdekes módon az ATP/fehérje és az ATP/sejtszám (PI) arányának erőteljes csökkenése, míg a GFP/ATP hányados emelkedése figyelhető meg (13. ábra, a). Ezt az emelkedést az okozza, hogy az ATP tartalom szignifikánsan csökken anélkül, hogy a teljes fehérjetartalom jelentősebben változna. Ez a megfigyelés alátámasztja javaslatunkat, hogy kizárólag az ATP meghatározása nem mindig lehet megfelelő életképességi paraméter. Az OTA növelte az ATP/fehérje arányt, míg más hányadosok csökkenést mutattak, de a változás kevésbé meredek a NaF által okozott változásokhoz képest (13. ábra, b). A rövid ideig történő CHX kezelés megnövekedett ATP/fehérje és ATP/sejtszám arányokat okozott, viszont jelentősen csökkentette a GFP/ATP hányadost, ami a kihasználatlan ATP felhalmozódását és a GFP transzlációs sebességének csökkenését mutatja (13. ábra, c). A hosszabb inkubálás alatt pedig az alacsonyabb ATP tartalommal együtt a megfelelő arányok is csökkenést mutattak (13. ábra, d). A 4 órás CHX kezelésben a GFP/ATP arány alacsonyabb, mint a 24 órás CHX inkubálás után, mivel az ATP tartalom a 4 órás kezelés során megemelkedett, és 24 órás inkubálás után viszont jelentősen csökkent.

Életképesség és citotoxicitás tesztekénél is, ha ATP tartalmat vizsgálunk, akkor figyelembe kell venni, hogy az apoptotikus folyamatok magasabb energiaszintet igényelnek, mint a normál sejtes működés, ez ugyanis előfeltétele a programozott sejthalálnak [198]. Így, a magasabb ATP szint kimutatása nem mindig jelenti a sejtek nagyobb életképességét. Ebből

kifolyólag minden sejtalapú életképesség és citotoxicitás vizsgálatnak egy jól megbízható többparaméteres protokollon kell alapulnia, hogy pontos képet adjon a tesztvegyületek hatásairól és elkerülhetőek legyenek a mosási és mérési pontatlanságból, valamint sejtvesztéséből adódó hibák.



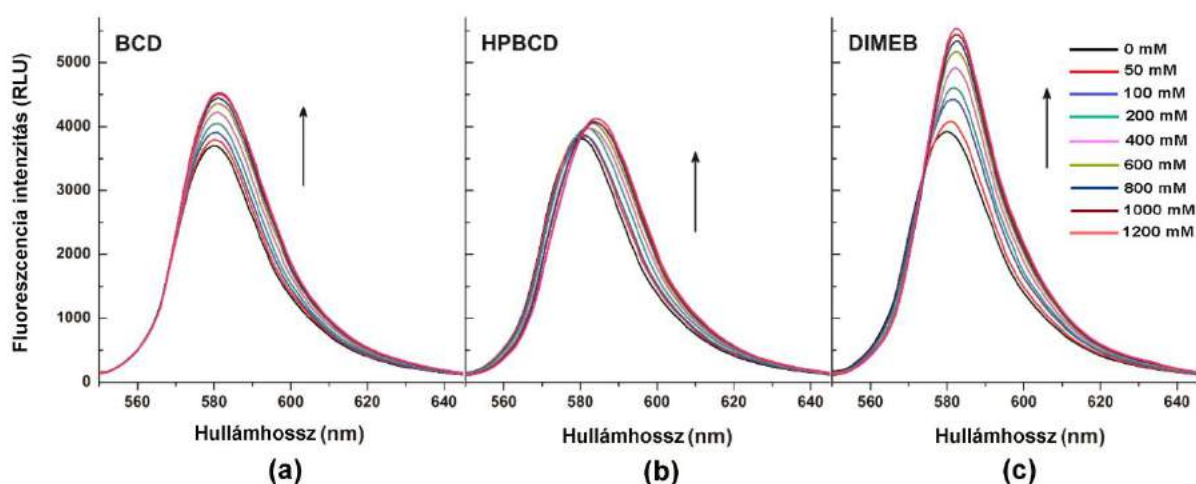
13. ábra. ATP/fehérje, ATP/PI és GFP/ATP arányok különböző anyagcsere inhibitorokkal történő kezelést követően: NaF (a), OTA (b), CHX (c, d). Az adatokat a kontroll minták %-ában fejeztük ki (átlag ± szórás, 4 független kísérlet, $n=4 \cdot 16$ párhuzamos mérés minden koncentráció esetén). *: szignifikáns változás a kontrollhoz képest (Egyutas ANOVA teszt, $p < 0,05$) [150]

V.1.2. β -ciklodextrinek hatásának vizsgálata rezazurin viabilitás teszttel, illetve ATP- és fehérjetartalom meghatározásával

V.1.2.1. Rezorufin-CD kölcsönhatások vizsgálata fluoreszcencia spektroszkópiai módszerrel

A CD-ek hatását a rezorufin fluoreszcencia intenzitására 25°C-on vizsgáltuk. A fluoreszcencia emissziós spektrumokat 570 nm gerjesztési hullámhosszt (a rezorufin

gerjesztési maximuma) alkalmazva vettük föl. A CD-ek koncentrációfüggő módon növelték a rezorufin fluoreszcencia intenzitását, valamint az emissziós hullámhossz maximum eltolódását figyeltük meg (14. ábra). A legerősebb intenzitás fokozódás a DIMEB esetében volt tapasztalható. Mivel a CD-ek önmagukban nem mutattak fluoreszcenciát az alkalmazott körülmények között, megfigyeléseink a rezorufin-CD komplexek kialakulását igazolják. Egy fluorofór jelintenzitását erősen befolyásolja a mikrokörnyezet polaritása. Jellemzően a vízmolekulák által kialakított hidrátburok csökkenti (részleges kioltó hatás) az aromás fluorofórok fluoreszcenciáját. A fluorofór kölcsönhatása egy CD-nel általában fluoreszcencia emelkedéssel jár. Ennek oka, hogy miközben a fluorofór „beleül” a CD apoláris üregébe, hidrátburka megbomlik, így a vízmolekulák részleges kioltó hatása csökken [183,184].



14. ábra. Rezorufin ($0,4 \mu\text{M}$) fluoreszcencia emissziós spektrumai BCD (a), HPBCD (b), és DIMEB (c) jelenlétében 0; 50; 100; 200; 400; 600; 800; 1000 és 1200 mM koncentrációkban, PBS közegben ($\text{pH } 7,4$). Gerjesztés 570 nm (RLU= relative light unit) [143]

A rezorufin fluoreszcencia intenzitásának növekedését három emissziós hullámhosszon (580, 585 és 590 nm), 25°C -on értékeltük. Amint azt a 3. táblázat mutatja, $0,4 \mu\text{M}$ rezorufin és $1200 \mu\text{M}$ CD jelenlétében az I/I_0 arányokban 22-38% (BCD), 1-39% (HPBCD) és 37-53% (DIMEB) emelkedést figyeltünk meg a rezorufin emissziós jelében az 1,00 alap értékekhez képest. Figyelembe véve a rezorufin fluoreszcenciájának erős fokozódását CD-ek jelenlétében, a rezorufin-CD kölcsönhatás megzavarhatja a rezazurin alapú sejtes életképesség vizsgálatok eredményeit. Ez a jelenség a DIMEB esetében lehet a legjelentősebb, mivel a metilezett CD-ek endocitózissal bejutnak az intracelluláris térbe (míg a BCD és DIMEB erre nem képes) [199]. Emellett fontos kiemelni, hogy UV-Vis spektroszkópiai kísérletek alapján a rezazurin is hasonlóan stabil komplexeket képez a

vizsgált CD-ekkel, mint a rezorufin [143]. A reszazurin-CD kölcsönhatások ezáltal befolyásolhatják a vegyület celluláris felvételét, és ezzel együtt a viabilitás teszt megbízhatóságát is.

Mivel a sejtek reszazurinnal történő inkubálását az életképességi vizsgálatok során 37°C-on végzik, a rezorufin-CD komplex képződéseket ezen a hőmérsékleten is megvizsgáltuk. A komplexek stabilitása valamivel alacsonyabb volt 37°C-on mint 25 °C-on, de nem tapasztaltunk jelentős eltérést (3. táblázat).

3. táblázat. *A rezorufin (0,4 μM) fluoreszcencia fokozása (I/I₀) CD-k (1200 μM) jelenlétében, különböző emissziós hullámhosszakon (λ_{exc} = 570 nm), és a rezorufin-CD komplexek kötési állandóinak decimális logaritmikus értékei (K; L/mol) 25 és 37 °C-on a fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok alapján számítva (átlag ± szórás, 3 külön meghatározásból) [143]*

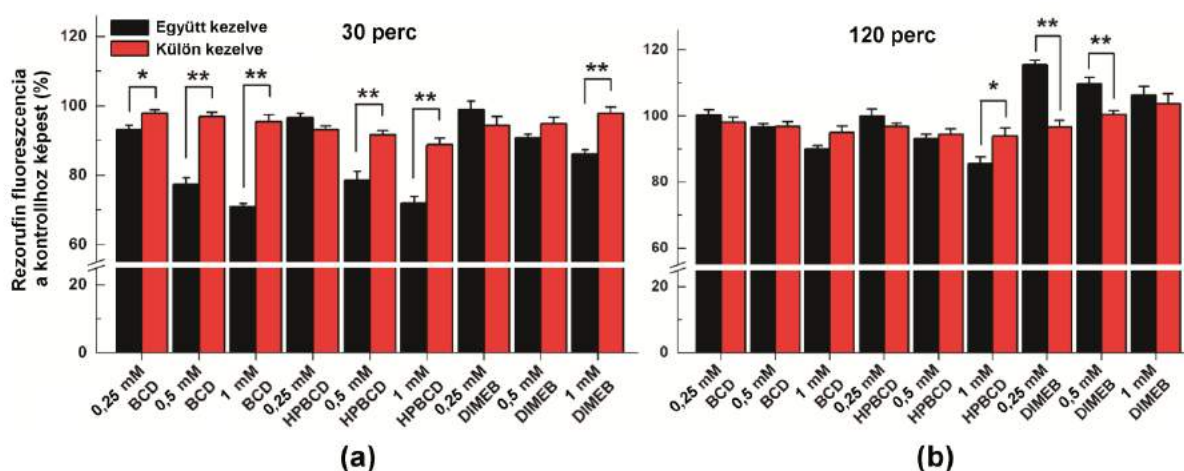
	I/I₀ (580 nm)	I/I₀ (585 nm)	I/I₀ (590 nm)	logK (25° C)	logK (37 °C)
BCD	1,22 (± 0,02)	1,30 (± 0,02)	1,38 (± 0,02)	3,31 (± 0,08)	3,09 (± 0,03)
HPBCD	1,01 (± 0,01)	1,20 (± 0,01)	1,39 (± 0,02)	3,37 (± 0,05)	3,26 (± 0,05)
DIMEB	1,37 (± 0,04)	1,52 (± 0,04)	1,53 (± 0,03)	3,59 (± 0,04)	3,52 (± 0,05)

V.1.2.2. Reszazurin alapú sejtes viabilitás mérések eredményei lemezolvasón

A CD-ek sejten belüli hatását kétféle inkubálási időtartamot (30 perc és 120 perc) követően vizsgáltuk. A HepG2 máj karcinóma sejteket 0; 0,25; 0,5 és 1 mM CD-koncentrációval kezeltük 2 μM reszazurin jelenlétében (együttes kezelés). Továbbá, mivel a CD-ek képesek lehetnek befolyásolni a HepG2 sejtek életképességét [183], azt is megvizsgáltuk, hogy a sejtek külön kezelése (először CD-nel, majd az oldat eltávolítása után reszazurinnal) hogyan befolyásolja a sejtek életképességét. Az 15. ábra az együttes kezelések és az elkülönített inkubációk eredményeit mutatja be 30 és 120 perc elteltével. A 30 perces együttes kezelés (CD + reszazurin egyszerre volt jelen a tápoldatban) 0,5 és 1 mM BCD és HPBCD esetén szignifikánsan erősebben csökkentette a rezorufin jelét, mint a külön kezelt sejtekben (ahol a CD-t tartalmazó oldatot CD-mentesre cseréltük a reszazurinosis kezelés előtt) (15. ábra, a). A CD-ek a vendégmolekulához kötődve gátolhatják annak kölcsönhatását egy célmolekulával (pl. fehérjékkel), vagy befolyásolhatják a vendégmolekula sejtmembránon való átjutását. A gyógyszerek celluláris felvételét – többek között a vízdoldhatóságuk növelése révén – elősegíthetik a CD-ek, amennyiben a zárványkomplexek stabilitása alacsony (logK értékük 2 és 3 közötti) [200]. Ezzel szemben, a magasabb stabilitású CD komplexek kialakulása a vendégmolekula erőteljesebb csapdázódását eredményezve limitálhatja a celluláris felvételt [183]. Utóbbi jelenség magyarázhatja eredményeinket: együttes inkubáció során a stabil reszazurin-CD komplexek kialakulása gátolhatja a vendégmolekula sejtbe

jutását, ezáltal a képződő rezorufin mennyisége és így a mért emissziós jel is alacsonyabb. A BCD-hez és a HPBCD-hez képest a DIMEB kisebb különbségeket okozott az együtt kezelt és a külön kezelt sejtek között a 30 perces inkubációkban (15. ábra, a). Ez adódhat pl. abból, hogy a DIMEB (a másik két tesztelt CD-nel szemben) bejut a sejtbe és ott rezorufinnal kölcsönhatásba lépve fokozhatja annak emissziós jelét, ami kompenzálhatja a rezazurin kisebb celluláris felvételéből adódó jelcsökkenést.

Nagyon érdekes, hogy az előző bekezdésben részletezett (30 perces inkubáció esetében mért) különbség a BCD és a HPBCD kapcsán a 120 perces kezelés után már nem tapasztalható. Ezzel szemben, a DIMEB-nél 120 perces kezelést követően ellentétes eredményeket tapasztaltunk (15. ábra, b), mint a 30 perces inkubációk esetében. Ez a jelenség valószínűleg azzal magyarázható, hogy a hosszabb inkubációs idő alatt nagyobb mennyiségű DIMEB jut be a sejtekbe, ami egyrészt bevihet a sejtbe magával egy jelentősebb mennyiségű rezazurint és/vagy fokozhatja az intracellulárisan képződött rezorufin fluoreszcenciáját. Emellett az együtt kezelt és a külön kezelt sejtek közötti különbség csökkent a DIMEB koncentrációk emelkedésével. Úgy gondoltuk, hogy ennek a magasabb DIMEB mennyiségek citotoxicitása lehet az oka, így hipotézisünk igazolására további kísérleteket végeztünk.

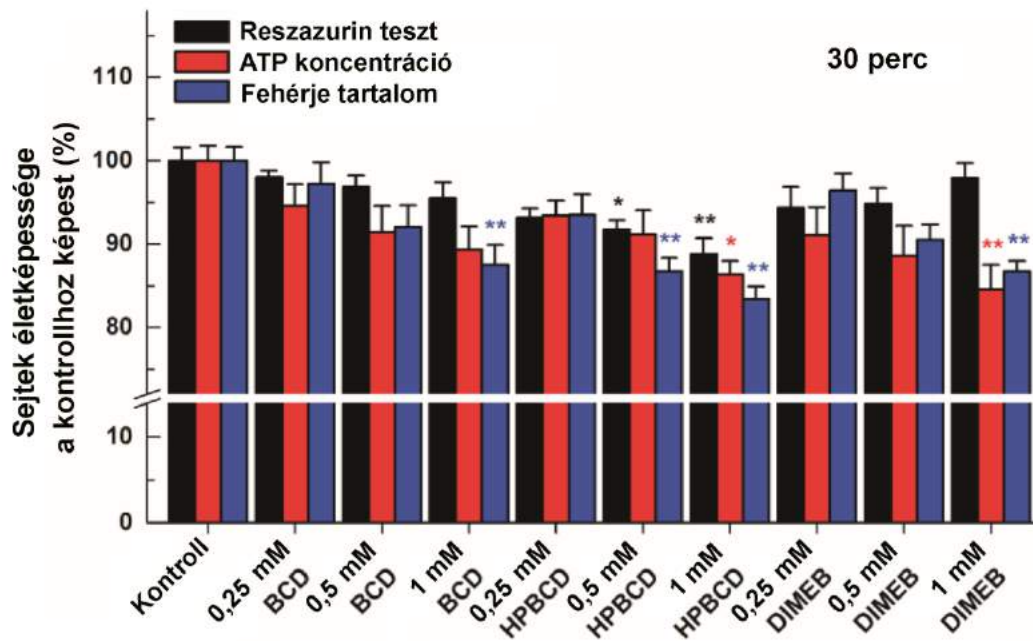


15. ábra. Reszazurin alapú sejt viabilitás mérés HepG2 sejt kultúrán. A sejteket CD-nel és rezazurinnal együtt inkubáltuk (fekete oszlop), illetve külön a CD tartalmú tápoldat eltávolítása után adtuk hozzá a rezazurint (piros oszlop) 30 perces (a) és 120 perces (b) inkubációs időt alkalmazva. Az adatokat a kontroll minták %-ában fejeztük ki (átlag ± szórás, 5 független kísérlet, $n=5 \cdot 8$ párhuzamos mérés minden koncentráció esetén), szignifikáns változás (kétmintás T-teszt, $*p < 0,05$; $**p < 0,01$) [143]

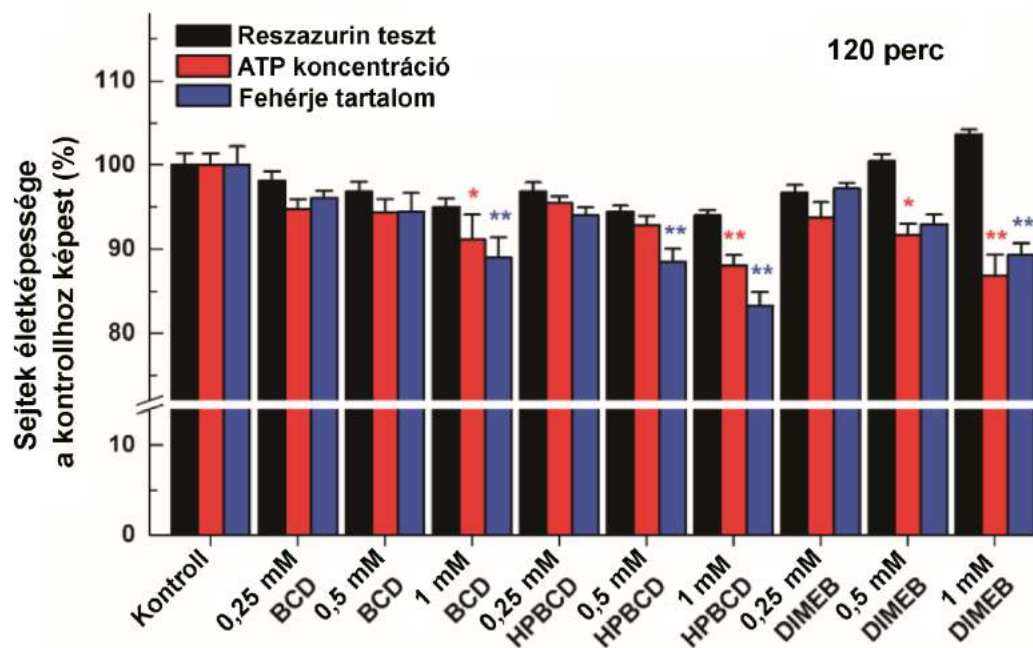
A külön CD majd rezazurin kezelésből kapott sejtes eredményeket összehasonlítottuk az ATP és a teljes sejten belüli fehérje tartalmakkal (16. ábra). Ehhez a sejteket a CD kezeléseket (30 és 120 perc) után, rezazurin inkubálás nélkül mértük le. Mind az ATP, mind a

fehérje eredmények alapján a CD-ek által indukált viabilitás csökkentést figyeltünk meg. A magasabb DIMEB koncentrációk jelenlétében erőteljesebb viabilitás csökkenés figyelhető meg. Ez megmagyarázhatja, hogy 120 perces inkubációt követően a 0,25 mM DIMEB esetén megfigyelt jelemelkedés mértéke miért csökken le 0,5 és 1 mM-os DIMEB koncentrációk esetében (15. ábra, b).

Megfigyeléseink arra mutatnak rá, hogy a különböző CD-ek komplex módon képesek befolyásolni a rezazurin viabilitás teszt eredményeit. Így olyan kísérletekben, melyek során CD-eket is alkalmaznak, a rezazurin-alapú sejtes életképesség vizsgálat eredményei nem tűnnek megbízhatónak.



(a)



(b)

16. ábra. Reszazurin alapú sejtes viabilitás mérés összehasonlítása ATP- és fehérjetartalom mérésével. A HepG2 sejteket külön inkubáltuk CD-nel majd rezazurinnal (vagyis a CD-t tartalmazó oldatot kicseréltük a rezazurin hozzáadása előtt) (fekete oszlop), illetve a CD kezelést követően (rezazurin hozzáadása nélkül). ATP tartalmat (piros oszlop) valamint teljes fehérjetartalmat mértünk (kék oszlop). A 30 perces (a) valamint 120 perces (b) CD inkubációk eredményeit tüntettük föl. Az adatokat a kontroll minták %-ában fejeztük ki (átlag ± szórás, 5 független kísérlet, $n=5 \cdot 8$ párhuzamos mérés minden koncentráció esetén, szignifikáns változás (kétmintás T-teszt, $*p < 0,05$; $**p < 0,01$) [143]

V.2. Etnobotanikai gyűjtések eredményei

A kijelölt 4 növényfaj esetében a feljegyzett népi elnevezések a székely nyelvjárásból származnak. A helyi nevek száma 1 és 6 között változott, a legtöbb népi elnevezést a *L. nummularia* esetében írtuk le (4. táblázat). Mivel a *F. magellanica* és *F. triphylla* növényt a helyiek nem különítik el, így általánosan a fukszia elnevezést használták. Átfedő helyi neveket találtunk a széles körben ismert fukszia fajok és a *L. nummularia* esetében is a vizsgált településeken, míg a *L. nummularia* esetében terminológiai eltéréseket is megfigyeltünk a szomszédos falvak között (2-10 km távolság). A használt növényi részek elnevezései megfeleltek a hivatalos magyar drogterminológiának. Az említett növényi részek elsősorban a földfeletti hajtás és a lomblevél volt, amelyeket külsőleg alkalmaztak bőrbetegségek kezelésére, főleg borogatásként. A *L. nummularia* alkalmazását az alábbi szövegkörnyezetben említették Recsenyében: „*Gyermekkoromban, a nádiban, a Homoród régi medriben, emlékszem ott rengeteg volt (...), sebre használták.*” A *L. nummularia* esetében bőrproblémák mellett egyéb betegségek kezelését is (pl. gyomor- és vesebetegségek, reuma) feljegyeztük, például Homoródkarácsonyfalván: „*reumatikus dógokra, s az ilyen ízületekre borogatásnak; azt mondják, nagyon jó lábfájásnak*”, „*lábfájásra borogató, mosni a levivel*”. Lövétén a növény hajtását borogatóként, fürdőként használják lábfájás esetén: „*Akkor kötik reja, mikor megkucorodik, vagy a görcs megfogja, s sokszor fogja. Nos, azért mondják: ineresztő*”. Főzetét is említették borogatóként: „*Meg kell teának főzni, s például lábfájás, vagy kézre bele kell rakni. Le kell hűteni, úgy a test, ahogy bírja.*” Reumára: „*Teát főzünk, s akkor beletenni a lábat vagy pedig véle megmosni, vagy kezét. Úgy, hogy a testhőmérséklete bírja. Melegebbet, hidegebbet.*” Gyomorbetegségekre és sebek kezelésére is ismert: „*Megfőzi, megáztassa, s a sebet meggyógyítsa, kifakassza.*” A 4. táblázat a gyűjtések 4 fajra vonatkozó etnobotanikai eredményeit ismerteti.

A fukszia fajok esetében a leveleket a helyiek gyűjtéseink alapján „szökésre” használják, amely kék-fekete vérző kelést, mély tályogot vagy virulens pattanást jelent. A fukszia fajokra vonatkozóan nem találtunk korábbi tudományos közleményeket a hagyományos orvoslásban más országokban történő felhasználásukról, így feljegyzéseink megerősítik és kiegészítik a fajok korábban leírt adatait Erdélyben.

A hagyományos orvoslásban az *A. vulneraria* virágjait sebek, magas vérnyomás, szívelégtelenség, hányás, gyulladás, pattanások és anyagcserezavarok kezelésére használják. Ezen kívül száj- és torokfájdalmak gyógyítására, valamint a haj növekedésének fokozására is alkalmazzák. A növény etanolos kivonata gátló hatású az emberi herpeszvírus 1 és a poliovírus 2 szaporodására sejtenyészetben [99,201,202].

A *L. nummularia* népgyógyászati felhasználása széles körű, ugyanis hasmenés, láz, ízületi gyulladás, tuberkulózis valamint bőrbetegségek kezelésére is alkalmazzák [119].

4. táblázat. Gyűjtési helyszínek: (1) Gyimes (2004), Birkás-Frendl Kata gyűjtése; (2.1) Lövete (2008-2018), Papp Nóra gyűjtése, 2008; (2.2) Lövete (2008-2018) [112]; (3) Városhalva (2019), Mihalovits Fanni, Csepregi Rita és Papp Nóra gyűjtése; (4) Homoródszentmárton (2014-2018) [203]; (5) Csinód (2019), Birkás-Frendl Kata és Papp Nóra gyűjtése; (6) Recsenyéd (2016) [204]; (7) Homoródremete (2017), Lőrincz Péter gyűjtése; (8) Homoródszentpál (2013-2014), Papp Nóra gyűjtése, 2013; (9) Homoródmás (2013-2016) [205]; (10) Homoródkarácsonyfalva (2011) [121]; (11) Erdővidék (2010-2019), [206]; (12) Csinód, Egerszék (2007-2009), Birkás-Frendl Kata gyűjtése, 2007.

	Helyi elnevezés	Drog	Helyi adatok
<i>Anthyllis vulneraria</i> L.	medvetalpa ⁽¹⁾ ; szipókavirág ^(2.1)	földfeletti hajtás ^(2.1)	vérzéscsillapítóként ^(2.1)
<i>Fuchsia</i> fajok	fucszia ^(2.2, 3, 4, 5)	levél ^(2.2)	dísznövények ^(2.2, 3, 4, 5) ; levelét kelésre, szökésre borítják ^(2.2)
<i>Lysimachia nummularia</i> L.	fillérfű ^(2.2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) ; piculavirág, íneresztőfű ^(2.2) ; pillérfű, fillérlapi ⁽¹⁰⁾ ; folyóka ⁽¹¹⁾	földfeletti hajtás ^(2.2, 4, 6, 7, 8, 11, 12) ; levél ^(9, 10, 11)	sebre borogatóként ^(2.2, 4, 6, 9, 10, 12) ; gyomorbetegségekre ^(2.2) ; fájós lábra borogatóként ^(2.2, 7, 10) ; reumára ^(2.2, 12) , szájüreggyulladás, fogínygyulladás esetén ⁽⁸⁾ ; ujjsibbadásra, dagadt lábra, reumára teaként borogató ⁽¹⁰⁾ ; vesepanaszok esetén teaként, égési sérülésekre borogatóként ⁽¹¹⁾ ; végtagfájdalom esetén ⁽¹²⁾

V.3. Növényi kivonatok fenolos vegyületeinek szemi-kvantitatív elemzése LC-DAD-ESI-MS / MS készülékkel

Az etnomedicinai felhasználás alapján, hogy mely növényi részeket milyen formában alkalmazzák, illetve a későbbi sejtes vizsgálatok miatt is LC-DAD-ESI-MS/MS analitikai módszerekkel tanulmányoztuk az *A. vulneraria*, *F. magellanica*, *F. triphylla* és *L. nummularia* vizes és 50%-os (v/v) etanolos kivonatait, hogy megtudjuk, mely hatóanyagok lehetnek felelősek a biológiai hatásaikért. Az LC technikában a kromatogramok monitorozásához a 280 nm-t választottuk detektálási hullámhosszként, ugyanis ezen a hullámhosszon minden komponens jelentős elnyeléssel bír. Összehasonlítottuk a kapott kromatogramokat, UV spektrumokat és tömegspektrometrikus fragmentációs mintázatokat az irodalmi adatok referenciaspektrumaival és relatív retenciójával is. Annak érdekében, hogy szemi-kvantitatív eredményeket kapjunk, a vegyületek relatív abundanciáját (%) adtuk meg,

vagyis az adott vegyület csúcs alatti területének %-a az összes vegyület összesített csúcs alatti területéből lett számolva. Összesen 82 komponenst tudunk elválasztani a mintákban, közöttük galluszsav-származékokat, hidroxifahéjsav-származékokat és flavonoid-glikozidokat, továbbá a *F. magellanica* és *F. triphylla* kivonataiban 8 antocianin vegyületet is kimutattunk. A részletes eredmények hosszabb terjedelmük miatt a „Mellékletek” részben kerülnek bemutatásra, közöttük az azonosított komponensek (M1. táblázat), a kivonatok 280 nm hullámhosszon mért UV-kromatogramjai (M2-9. ábra), valamint az összesített hatóanyagok előfordulása a növények vizes és etanolos kivonataiban dendrogram formájában (M10-11. ábra).

Az *A. vulneraria* mintájában többségében flavonol-glikozidok fordulnak elő. Nagy mennyiségben jellemzően előforduló aglikon a kempferol (23. és 25. komponens) és a kvercetin (40. vegyület) voltak, valamint metilezett formái is előfordultak az izoramnetin (33. komponens) és ramnocitrin (77. vegyület) aglikonoknak. Ezen kívül a vizes kivonat sokféle kávé- (5. és 6.), kumarin- (7. és 10.) valamint ferulasav-származékot (20. és 22.) tartalmazott. Irodalmi adatok alapján a növényben általánosan előforduló flavonoidok a kvercetin-, kempferol-, izoramnetin-, ramnocitrin-, ramnetin-, fizetin- és geraldol-származékok [207]. Egy később megjelent közlemény egy triterpenoid szapogenin (szójaszapogenol B) előfordulását írta le a növényben [99]. Lorenz és munkatársai az *A. vulneraria*-ból származó félpolaris hatóanyagok vizsgálatát végezték. A munkánkhoz hasonlóan ők is kempferol, kvercetin, izoramnetin és ramnocitrin glikozidokat, valamint ferulasav származékokat mutattak ki, továbbá szaponinok előfordulását is leírták [208].

A fukszia mintákból az általános flavonol-származékok mellett szokatlan kvercetin-galloil-hexozidokat (46., 50. és 53.) és kempferol-galloil-hexozidot (58.) mutattunk ki, nagyobb mennyiségben a *F. magellanica* mintájában. A levélkivonatokban antocianin származékok is dominánsak voltak: mindkét fukszia mintában peonidin-dihexozid-izomer (V. vegyület) volt jelen, míg a cianidin-dihexozid (II. komponens) csak a *F. magellanica* kivonatokban fordult elő. A fukszia fajok legelső fitokémiai analízise Crowden és munkatársainak nevéhez fűződik, akik 1977-ben tették közzé a fukszia fajok és hibridjeik virágjának antocianintartalmát. A *F. triphylla* virágjából pelargonidin-glikozidokat, míg a *F. magellanica* virágjából peonidin-glikozidokat izoláltak [107]. Később a *F. magellanica* virágjából további antocianinokat, főként peonidin- és cianidin-glikozidokat mutattak ki [108], amely megegyezik az általunk végzett fitokémiai analízissel, annak ellenére, hogy mi levélkivonatokot vizsgáltunk. A *F. magellanica* bogyóterméséből izolált fő antocianidinként cianidin- és delfinidin-származékok említhetők [109]. Averett és munkatársai flavonoidokat

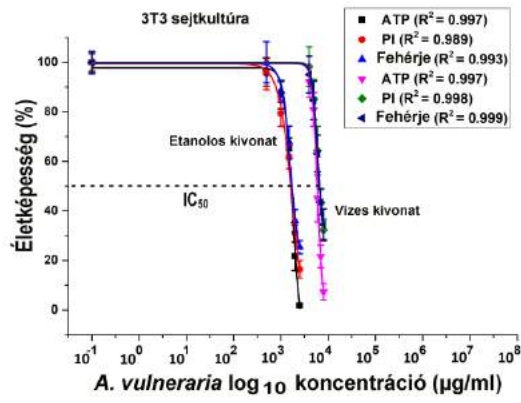
izoláltak különböző fukszia fajok és hibridek levélmintáiból. A *F. magellanica* leveléből kempferol-, kvercetin-, apigenin valamint luteolin-glikozidokat, míg a *F. triphylla* leveléből kempferol- és kvercetin-glikozidokat mutattak ki [111]. Ezek az eredmények nagyrészt megegyeznek az általunk izolált hatóanyagokkal.

A *L. nummularia* is nagy mennyiségben tartalmazott flavonol-glikozidokat, azonban a mintában főleg miricetin-glikozidok (43., 45., 68. és 69. komponens) voltak uralkodók. Mind a vizes, mind az etanolos kivonatban a miricetin 3-O-dezoxi-hexozid (49.) volt a fő összetevő. A vizes minta esetében a kumarin- (7., 14. és 15.) és a ferula-glükarát (18., 20. és 22. vegyület) izomerek voltak jellemzőek. Korábbi irodalmi források alapján a növény elsősorban flavonoidokat (miricetin-, kempferol- és kvercetin-glikozidok) és fenolsavakat (kávésav-származékok) tartalmaz [117,118]. Eredményeinket alátámasztják a Tóth és munkatársai által kapott adatok, akik szintén nagy mennyiségben mutattak ki miricetin-származékokat a növény földfeletti virágos hajtásából, ráadásul a vizsgált *Lysimachia* fajok közül a *L. nummularia* frakciójában detektálták azokat a legnagyobb mennyiségben [118].

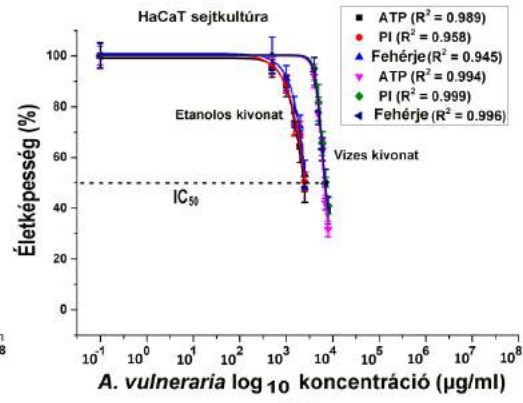
V.4. Növényi kivonatok dózis-hatásának vizsgálata

V.4.1. A lemezolvasón mért citotoxicitás vizsgálatok eredményei

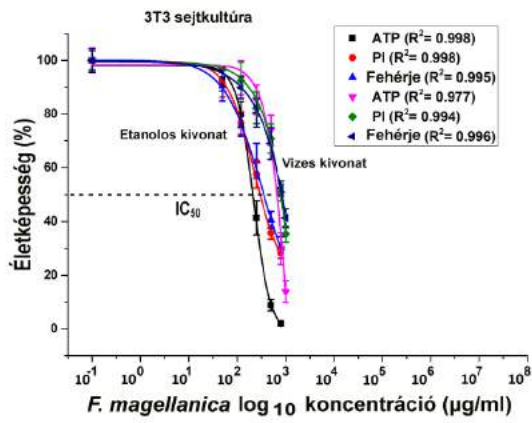
A 3T3 és a HaCaT sejteken kapott citotoxikus adatokat a 17. ábra mutatja be. Általános megfigyelés volt, hogy az etanolos kivonatok hatékonyabban csökkentették mindkét sejt vonal ATP szintjét, sejtszámát és fehérjetartalmát dózisfüggő módon, mint ugyanazon növény vizes kivonata. Azonban oldószer típustól függő jelentősen nagy különbségeket a fukszia fajok esetében nem figyeltünk meg, ugyanis mind az etanolos, mind a vizes kivonatok közel hasonló toxikus hatást mutattak a vizsgált sejt vonalakban (17. ábra, c, d, e és f). Az oldószerek közötti eltérések oka nem a minták etanol tartalma volt, hiszen azt 1,5 %-ban maximalizáltuk, ami nem befolyásolja jelentősen a sejtek életképességét. Az általános IC₅₀ értéket ennél a módszernél nem lehet megállapítani, ugyanis az függ attól melyik intracelluláris paramétert vizsgáljuk. Emiatt az etanolos és a vizes kivonatokra kapott nyers adatok %-os értékei a „Mellékletek” részben külön kerülnek bemutatásra (M3 és M4. táblázat). A fibroblaszt sejtenyészet érzékenyebben reagált a kivonatok expozíciójára, mint a keratinociták. A potenciálisan citotoxikus növényi vegyületek iránti megnövekedett érzékenység egyik lehetséges magyarázata az lehet, hogy a fibroblasztok a dermiszben helyezkednek el, míg a keratinociták többnyire a felső bazális membrán zónában (epidermisz) találhatóak, ezért ellenállóbbaknak kell lenniük a külső, esetleges károsító tényezőkkel szemben [209].



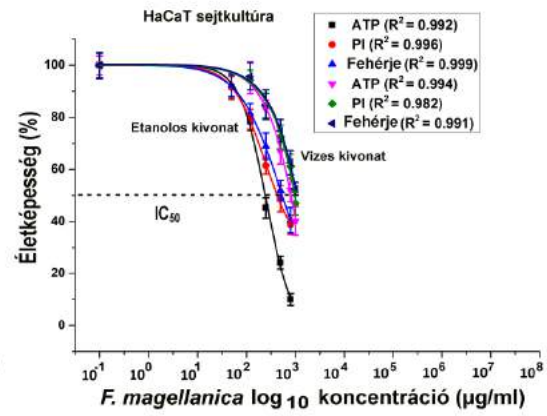
(a)



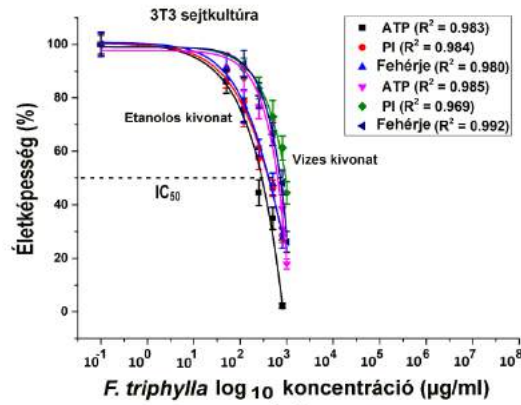
(b)



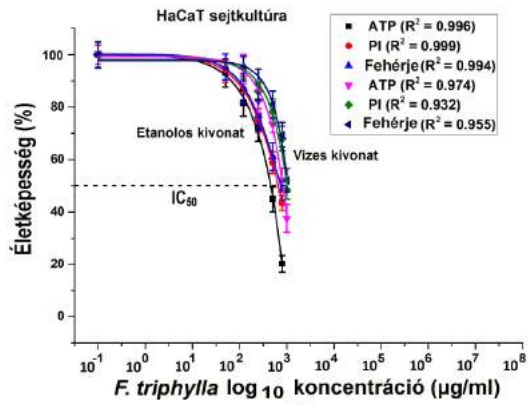
(c)



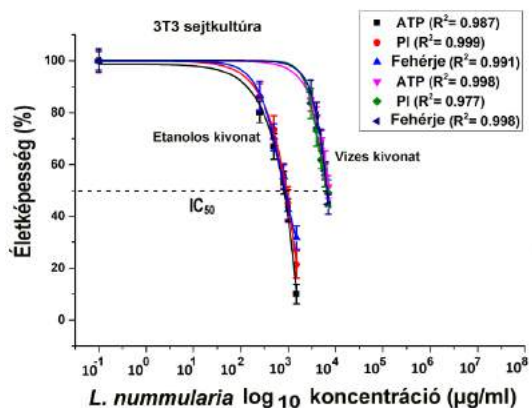
(d)



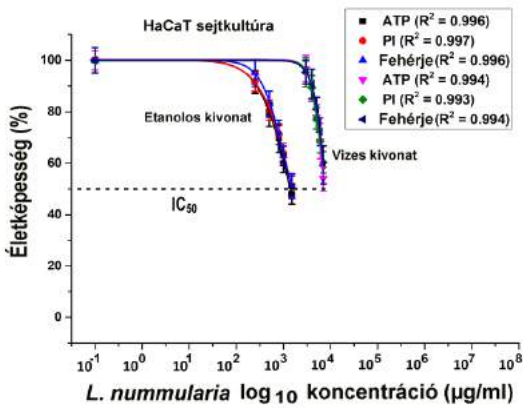
(e)



(f)



(g)



(h)

17. ábra. 3T3 és HaCaT sejtek intracelluláris ATP-tartalma, sejtszáma (PI), valamint összes fehérjetartalma dózis-válasz görbe illesztéssel: az *A. vulneraria* citotoxikus hatása 3T3 és HaCaT sejteken (**a, b**); a *F. magellanica* citotoxikus hatásai 3T3 és HaCaT sejteken (**c, d**); a *F. triphylla* citotoxikus hatásai 3T3 és HaCaT sejteken (**e, f**); a *L. nummularia* citotoxikus hatása 3T3 és HaCaT sejteken (**g, h**). Az adatokat a kontrol minták %-ában fejeztük ki (átlag \pm szórás, 5 független kísérlet, $n=5*4$ párhuzamos mérés minden koncentráció esetén). A dózis-válasz görbéket log10 transzformációval és nem lineáris görbeillesztéssel hoztuk létre. Az egyes kezelésekhez kiszámítottuk a korrelációs együtthatókat (R^2) is [122]

V.4.2. Áramlási citométeren mért citotoxicitás vizsgálatok eredményei

A növények etanolos kivonatainak lemezolvasós módszer alapján feltételezett szubtoxikus koncentrációit apoptózis-nekrózis vizsgálatoknak vetettük alá Annexin V-7AAD áramlási citometriás módszerrel 3T3 (5. táblázat) valamint HaCaT (6. táblázat) sejtvonalon. A két különböző sejtvonalnál hasonló eredményeket kaptunk, nevezetesen a növényi kivonatok alkalmazott koncentrációi nem okoztak szignifikáns apoptotikus/nekrotikus hatást, ugyanis a sejtek többsége intakt maradt (a nekrotikusan elhalt sejtek aránya 4% alatt volt mindkét sejtvonalban). A háttér fluoreszcencia meghatározására alkalmazott FMO (fluoreszcencia mínusz egy) kontrollok stratégiájára alkalmazott példa ábra a „Mellékletek” részben található (M1. ábra).

5. táblázat. *A. vulneraria*, *F. magellanica*, *F. triphylla* és *L. nummularia* 50%-os (v/v) etanolos kivonatával kezelt 3T3 sejtvonal apoptózis-nekrózis vizsgálatának adatai Annexin V-7AAD áramlási citometriás módszerrel [122]

3T3 fibroblaszt sejtvonal				
Kezelések	Annexin V - 7AAD módszer			
	Élő sejtek (%)	Nekrotikus sejtek (%)	Korai apoptotikus sejtek (%)	Késői apoptotikus sejtek (%)
Kezeletlen sejtek	97,13	2,06	0,66	0,15
50 µg/ml <i>A. vulneraria</i>	96,29	2,46	1,00	0,25
100 µg/ml <i>A. vulneraria</i>	96,00	2,90	0,83	0,27
200 µg/ml <i>A. vulneraria</i>	96,89	2,22	0,70	0,20
2,5 µg/ml <i>F. magellanica</i>	96,95	2,03	0,75	0,26
5 µg/ml <i>F. magellanica</i>	96,27	2,67	0,79	0,27
10 µg/ml <i>F. magellanica</i>	96,62	2,25	0,78	0,34
2,5 µg/ml <i>F. triphylla</i>	97,74	1,26	0,84	0,17
5 µg/ml <i>F. triphylla</i>	98,15	1,01	0,71	0,13
10 µg/ml <i>F. triphylla</i>	97,57	1,50	0,62	0,30
10 µg/ml <i>L. nummularia</i>	95,63	2,98	1,05	0,33
25 µg/ml <i>L. nummularia</i>	95,33	3,31	1,07	0,29
50 µg/ml <i>L. nummularia</i>	95,48	2,81	1,34	0,38

6. táblázat. *A. vulneraria*, *F. magellanica*, *F. triphylla* és *L. nummularia* 50%-os (v/v) etanolos kivonatával kezelt HaCaT sejtvonal apoptózis-nekrózis vizsgálatának adatai Annexin V-7AAD áramlási citometriás módszerrel [122]

HaCaT keratinocita sejtvonal				
Kezelések	Annexin V - 7AAD módszer			
	Élő sejtek (%)	Nekrotikus sejtek (%)	Korai apoptotikus sejtek (%)	Késői apoptotikus sejtek (%)
Kezeletlen sejtek	99,04	1,31	0,49	0,47
50 µg/ml <i>A. vulneraria</i>	96,84	1,56	0,51	1,09
100 µg/ml <i>A. vulneraria</i>	95,29	3,36	0,51	0,83
200 µg/ml <i>A. vulneraria</i>	96,06	2,60	0,35	0,99
2,5 µg/ml <i>F. magellanica</i>	97,76	1,39	0,47	0,37
5 µg/ml <i>F. magellanica</i>	97,08	2,19	0,38	0,34
10 µg/ml <i>F. magellanica</i>	97,56	1,61	0,54	0,28
2,5 µg/ml <i>F. triphylla</i>	97,98	1,06	0,54	0,42
5 µg/ml <i>F. triphylla</i>	97,68	1,33	0,54	0,45
10 µg/ml <i>F. triphylla</i>	98,04	0,91	0,63	0,42
10 µg/ml <i>L. nummularia</i>	97,19	1,70	0,42	0,69
25 µg/ml <i>L. nummularia</i>	96,89	1,86	0,41	0,84
50 µg/ml <i>L. nummularia</i>	96,15	2,49	0,44	0,91

V.5. MIC értékek meghatározása antimikrobiális hatás vizsgálatához

A növényi kivonatok antimikrobás vizsgálatát és a MIC₈₀ értékek meghatározását Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokon (7. táblázat) a Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinikai és Laboratóriumi Standardok Intézete) követelményei alapján végeztük el.

A kapott MIC₈₀ értékek alapján, az alábbi módon csoportosítottuk a tesztelt növényi minták eredményeit: a 100 µg/ml alatti értékeket mutató kivonatokat tekintettük „erős” antimikrobiális hatásúaknak; a 100-500 µg/ml-ig „mésékelt”, az 500-1000 µg/ml közöttieket „gyenge” hatásúaknak, míg a több mint 1000 µg/ml feletti értéket mutató kivonatok „inaktív” besorolást kaptak. Ezek alapján a *F. magellanica* és a *F. triphylla* etanolos kivonatai „erős” antimikrobás tulajdonságúnak tekinthetők *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. pyogenes* és *P. aeruginosa* baktériumok ellen, mivel MIC₈₀ értékük 5-60 µg/ml között változott. Összehasonlítva az eritromicin pozitív kontrollal, amelynek MIC₈₀ értékei 0,1-42 µg/ml koncentrációk között mozogtak, az *A. vulneraria* és *L. nummularia* etanolos kivonatai „mésékelt” antimikrobiális hatást mutattak *B. subtilis* és *S. pyogenes* ellen, továbbá az *A. vulneraria* „gyenge” aktivitású volt *S. aureus* ellen. Érdekes megfigyelés volt, hogy a vizsgált növényi kivonatok közül csak a fukszia fajok vizes kivonatai voltak hatékonyak a tesztbaktériumok ellen, azon belül is a *S. aureusra*, *B. subtilisre* és *S. pyogenesre* (MIC₈₀ értékek: 17-65 µg/ml koncentrációk között).

A vizsgált növényi kivonatok közül egyik sem mutatott antimikrobás hatást az *E. coli* baktérium ellen.

A vizsgált növényfajokra vonatkozóan nem találtunk korábbi adatokat azok antimikrobás hatásairól, ezért hatóanyagtartalmuk alapján hasonlítottuk össze eredményeinket irodalmi forrásokkal.

A fukszia fajok kiemelkedő antimikrobás hatásáért antocianintartalmuk lehet felelős. Korábbi publikációk eredményei alapján a magas antocianintartalmú bogyós gyümölcsök kivonatai gátló hatásúak voltak a Gram-pozitív (*B. subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*) és Gram-negatív (*Citrobacter freundii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*) baktériumok növekedésére is [83,210-212] a vegyület saját pH-ján (értéke 2 körül), míg semleges pH értékek mellett az antocianinok csökkent antimikrobiális aktivitást mutattak, valószínűleg instabilitásuk miatt [89]. További különbség a vizsgált növényi kivonatok között, hogy a fukszia fajok hidroxibenzoésavakat is tartalmaztak, amelyek antimikrobiális hatású vegyületekként ismertek [25,91].

A *L. nummularia* levélkivonataiban a fő flavonoidok a miricetin-származékok voltak, amelyek erős antibakteriális hatással rendelkeznek [91], ennek ellenére gyengébb antimikrobás aktivitást tapasztaltunk, összehasonlítva a pozitív kontrollal és a tesztelt fukszia fajok eredményeivel.

7. táblázat. *A. vulneraria*, *F. magellanica*, *F. triphylla* és *L. nummularia* 50%-os (v/v) etanolos és vizes kivonatainak minimális gátló koncentrációja (MIC_{80}) *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* és *S. pyogenes* baktériumok ellen. Az összesített adatok 5 független kísérlet, 3 ismétlésben történő eredményeit mutatják ($n=5*3$). Az összehasonlítások eritromicinnel, mint pozitív kontrollal történtek. N.D: nem detektálható [122]

		MIC_{80} ($\mu\text{g/ml}$)	
		Etanolos kivonatok	Vizes kivonatok
<i>Escherichia coli</i>	<i>eritromicin</i>	30,56 – 42,88	
	<i>A. vulneraria</i>	N.D.	N.D.
	<i>F. magellanica</i>	N.D.	N.D.
	<i>F. triphylla</i>	N.D.	N.D.
	<i>L. nummularia</i>	N.D.	N.D.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>eritromicin</i>	69,91 – 82,76	
	<i>A. vulneraria</i>	N.D.	N.D.
	<i>F. magellanica</i>	55,03 - 58,91	N.D.
	<i>F. triphylla</i>	49,03 - 58,87	N.D.
	<i>L. nummularia</i>	N.D.	N.D.
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>eritromicin</i>	0,09-0,25	
	<i>A. vulneraria</i>	715,90 - 835,92	N.D.
	<i>F. magellanica</i>	4,81 - 7,65	17,13 - 25,03
	<i>F. triphylla</i>	5,32 - 6,73	30,24 - 36,99
	<i>L. nummularia</i>	1063,75 - 1181,29	N.D.
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>eritromicin</i>	0,10 - 0,18	
	<i>A. vulneraria</i>	288,02 - 313,01	N.D.
	<i>F. magellanica</i>	13,91 - 15,72	52,73 - 65,03
	<i>F. triphylla</i>	14,55 - 22,66	33,16 - 45,33
	<i>L. nummularia</i>	160,90 - 164,28	N.D.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>eritromicin</i>	0,08 - 0,09	
	<i>A. vulneraria</i>	220,06 - 236,30	N.D.
	<i>F. magellanica</i>	11,83 - 14,99	41,72 - 44,91
	<i>F. triphylla</i>	11,61 - 17,92	41,95 - 43,23
	<i>L. nummularia</i>	179,43 - 203,56	N.D.

V.6. Teljes antioxidáns kapacitás vizsgálatok eredményei

A vizsgált növények etanolos és vizes kivonatainak antioxidáns tulajdonságait hagyományos, nem enzimatis, kémiai vizsgálatok segítségével értékeltük, köztük DPPH, TEAC, ORAC és ECL módszerekkel (18. ábra).

Fontos megemlíteni, hogy mivel a tesztek eltérő HAT vagy SET mechanizmusú reakción alapulnak, ezért az értékelésük is eltérő volt. Mivel a DPPH és a TEAC tesztek végpontmérésen és színváltozáson alapulnak, ezért IC_{50} koncentráció értékeket határoztunk meg, amely fordított arányossággal minél alacsonyabb, annál nagyobb antioxidáns hatást jelent, vagyis minél kisebb koncentrációban tudja csökkenteni az adott antioxidáns a szabad

gyököt, annál nagyobb antioxidáns tulajdonságot mutat. Ezzel szemben az ECL és az ORAC módszerek kinetikai mérésen alapulnak, ezért a görbe alatti területből számolt TE/g ($\mu\text{mol/g}$) koncentráció értékek minél magasabbak, annál nagyobb antioxidáns hatást jelentenek.

Általánosan elmondható, hogy az adott növény etanolos kivonata magasabb antioxidáns kapacitást mutatott, mint ugyanazon növényfaj vizes kivonata. Mind a 4 alkalmazott módszer esetén egységesen a fukszia fajok szembetűnően magasabb TAC értékeket mutattak (*F. triphylla* > *F. magellanica* > *L. nummularia* > *A. vulneraria*).

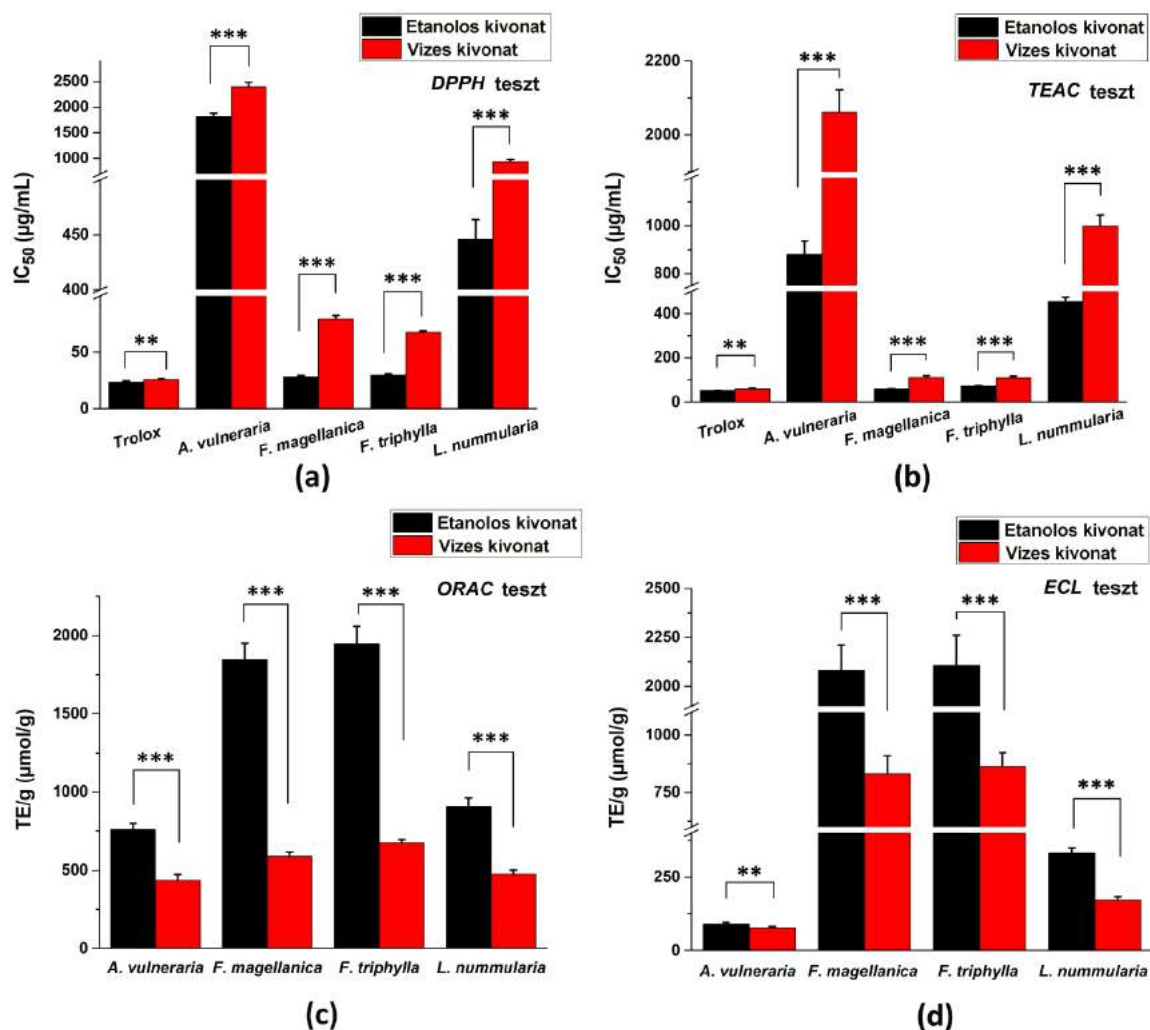
Ouerfelli és munkatársai az *A. vulneraria* leveléből és virágjából külön készített 50%-os etanolos kivonatainak vizsgálta a teljes antioxidáns kapacitását TEAC, DPPH és ORAC tesztekkel. Mivel a TEAC és a DPPH eredményeket más módszerrel értékelték, ezért csak az ORAC eredményeket tudjuk összehasonlítani. A levélkivonatok $980 \pm 3 \mu\text{mol/g}$, míg a virágok kivonata $1640 \pm 70 \mu\text{mol/g}$ TAC értékeket mutattak [213]. Ezzel szemben mi a növény földfeletti virágos hajtásának teszteltük az 50%-os etanolos és vizes kivonatait, ahol az etanolos kivonat esetében alacsonyabb $760 \pm 39,92 \mu\text{mol/g}$ TAC értéket kaptunk. Ghalem és munkatársai is külön vizsgálták a levelek és virágok antioxidáns kapacitását DPPH módszerrel, különböző (metanol, etil-acetát, butanol) frakciókból. A kivonatok IC_{50} értékei a DPPH szabad gyök semlegesítő vizsgálatban az oldószer típusától függően 1060 és 15.000 $\mu\text{g/ml}$ között változtak [100]. Ezzel szemben a DPPH módszernél mi etanolos és vizes kivonatokot teszteltünk, amelyek IC_{50} értékei etanolos frakció esetén $1820 \pm 54 \mu\text{g/ml}$, vizes frakció esetén $2391 \pm 92 \mu\text{g/ml}$ volt.

Tóth és munkatársai több *Lysimachia* faj metanolos kivonatának TEAC valamint DPPH szabad gyök semlegesítő hatását tesztelték [118]. Vizsgálatukban a *L. nummularia* mutatta a legmagasabb antioxidáns aktivitás értékeket (IC_{50} értékek $6,42 \pm 0,30 \mu\text{g/ml}$ DPPH módszernél; $5,21 \pm 0,27 \mu\text{g/ml}$ a TEAC teszténél), amelyet a mintában lévő magas miricetin mennyiségével magyaráztak. Ezzel szemben mi a vizsgálatainknál az etanolos és vizes kivonatok esetében is magasabb IC_{50} gátló értékeket kaptunk (etanolos kivonat során $445,87 \pm 17,99 \mu\text{g/ml}$ DPPH módszernél; $453,73 \pm 20,73 \mu\text{g/ml}$ a TEAC teszténél, míg a vizes kivonat során $939,82 \pm 37,97 \mu\text{g/ml}$ DPPH módszernél; $999,34 \pm 44,16 \mu\text{g/ml}$ a TEAC teszténél), ami alacsonyabb antioxidáns hatást jelent. Ezáltal az a következtetés vonható le, hogy a metanolos kivonat antioxidáns hatása jóval erősebb az általunk vizsgált etanolos és vizes kivonatokénál.

Az antioxidáns kapacitást mérő módszereket és a kapott eredményeket számos korlátozó faktor miatt nehéz összehasonlítani az irodalmi adatokkal. A különbségek több tényezőtől is származhatnak, biológiai szempontból például a növény vizsgált drogrésze,

vegetatív fázisa, technikai szempontból az eredmények értékelése, a kalibrációs kontroll, az extrakciós módszer, az oldószerek és azok koncentrációi.

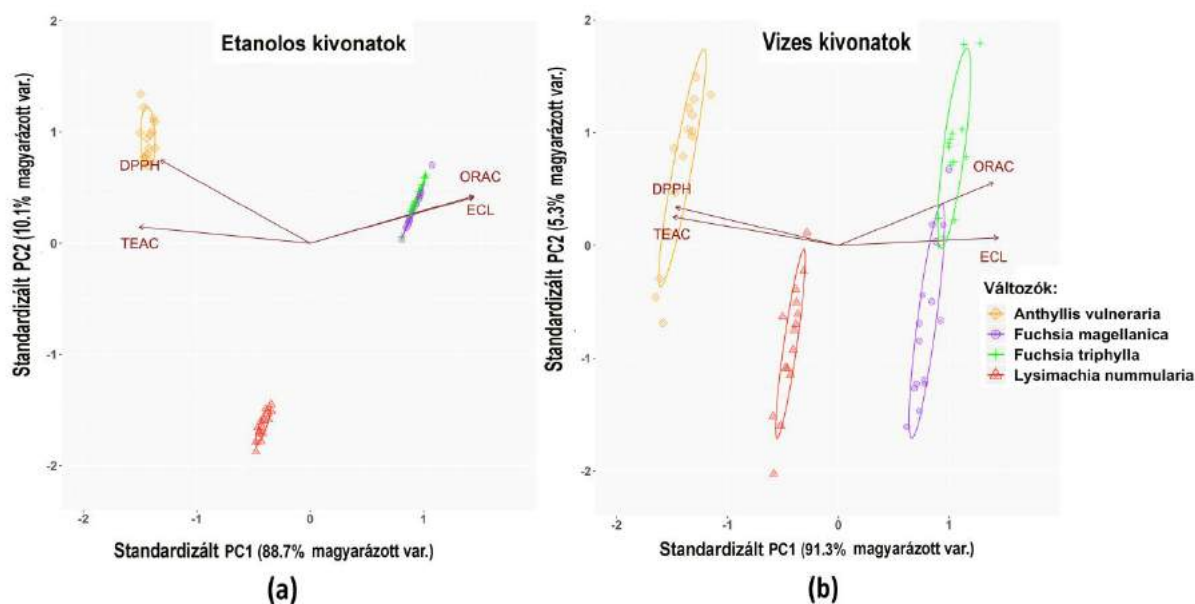
Elsősorban a fukszia fajokban mért (lásd. IV.3. *alfejezet*) jelentős antocianintartalom magyarázhatja a magas TAC értékeket, mivel ezek erős antioxidáns vegyületekként ismertek. Ugyanis az irodalmi adatok alapján a TAC-t mérő módszerek (TEAC, ORAC) esetében a tiszta antocianinok antioxidáns kapacitása 3–6-szorosa az azonos koncentrációjú Trolox teljesítményének [83,214].



18. ábra. *A. vulneraria*, *F. magellanica*, *F. triphylla* és *L. nummularia* 50%-os (v/v) etanolos és vizes kivonatainak teljes antioxidáns kapacitása (TAC) különböző spektroszkópai módszerekkel mérve: DPPH-módszer (a); TEAC-vizsgálat (b); ORAC-teszt (c) és ECL metodika (d). (Átlag ± szórás, 5 független kísérlet, $n=5 \cdot 3$ párhuzamos mérés esetén). A vizes és az etanolos kivonatok T-próbával hasonlítottuk össze (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) [122]

A PCA analízis eredményeit a 19. ábra mutatja be. Más kutatók eredményei mellett mi is összefüggéseket találtunk a TEAC és a DPPH, valamint az ORAC és az ECL módszerek között [154,163,215]. A növények etanolos kivonatai esetén erős pozitív korrelációt

figyeltünk meg az ORAC és az ECL módszerek között, míg mérsékelt korreláció állt fenn a TEAC és a DPPH vizsgálatok adatai között (19. ábra, a). Ezek a kapcsolatok szemben álltak a vizes kivonatok eredményeivel, mivel azok a TEAC és a DPPH módszerek között szorosabb kapcsolatot jeleztek, mint az ECL és ORAC tesztek között (19. ábra, b). A *F. magellanica* és *F. triphylla* etanolos kivonatai lényegesen jobban korreláltak egymással, mint vizes kivonataik esetében. Az antioxidáns módszerek közötti különbségek kémiai háttérükkel magyarázhatók. Az ECL és ORAC tesztek kémiai HAT mechanizmuson alapulnak, míg a TEAC és DPPH módszerek SET jellegű reakciók [154].



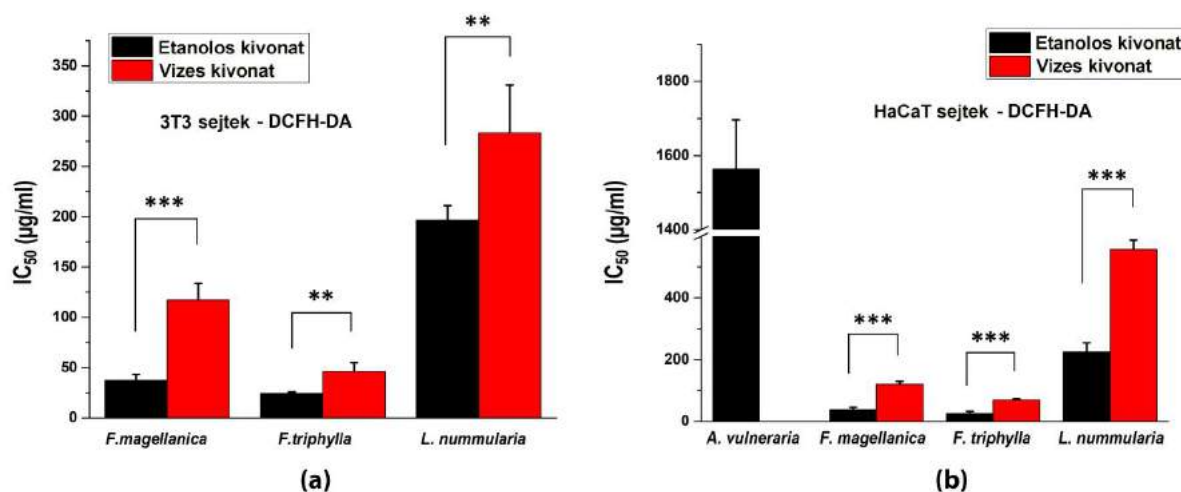
19. ábra. A vizsgált növényfajok etanolos (a) és vizes (b) kivonatainak PCA elemzése az elvégzett antioxidáns tesztek alapján. Az egyes tengelyek a magyarázott teljes variancia %-át tartalmazzák. A szimbólumok minden növényi kivonat esetében 15 egyedi adatot jelölnek [122]

V.7. Az intracelluláris ROS mérések eredményei

A TAC érték meghatározása sejt nélküli, kémiai vizsgálatokkal nem tükrözi teljes mértékben a komplex növényi minták viselkedését *in vivo*. Ezért fontos értékelni az antioxidánsok hatékonyságát biológiailag relevánsabb körülmények között, például a vegyületek sejtalapú antioxidáns vizsgálatokban történő tesztelésével [172]. A DCFH-DA és a DHR123 oxidációját a 3T3 és a HaCaT sejtekben az AAPH-ból származó peroxilcsoportok generálták [173]. A kivonatok hígítási sorára kapott gátló koncentrációkból számolt kalibrációs egyenes egyenletéből 50%-os inhibitoros koncentrációkat (IC₅₀) számoltunk.

A sejt alapú antioxidáns aktivitás mérésénél is a nem enzimikus, kémiai tesztekhez hasonló eredményt kaptunk. A növényi kivonatok nagy része csökkentette a DCF

fluoreszcenciáját, a számított 50%-os gátló koncentráció értékeit a 20. ábra mutatja. A fukszia fajok etanolos és vizes kivonatai gátolták a legerősebben az oxidált DCF forma fluoreszcens jelét mindkét sejtvonalban, összehasonlítva a többi növényi kivonattal. A 3T3 sejtvonalon az *A. vulneraria*-nak sem a vizes, sem az etanolos kivonata nem mutatott antioxidáns hatást a kezelés során (20. ábra, a), továbbá csak az etanolos extraktumnak volt mérhető antioxidáns tulajdonsága a HaCaT sejtenyészetben (20. ábra, b).



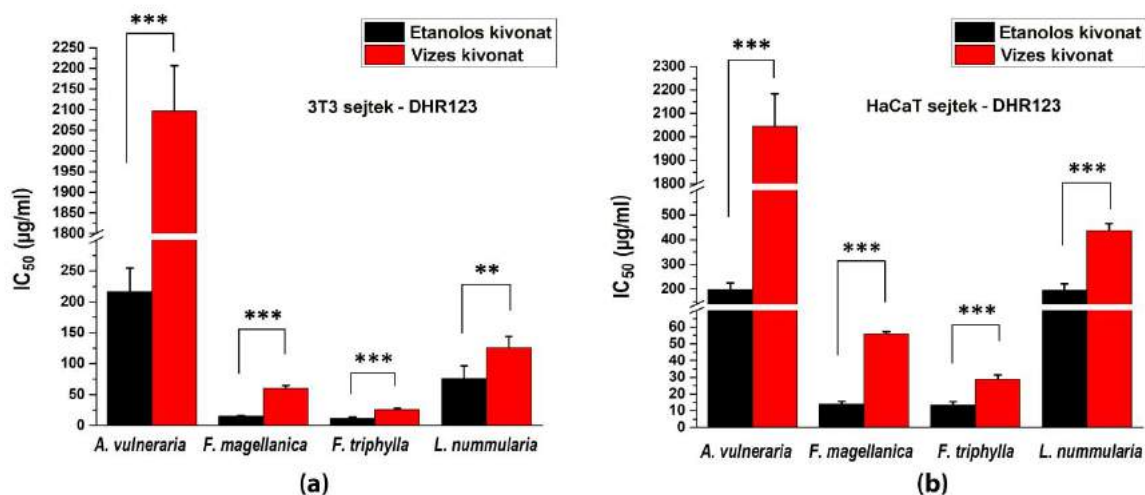
20. ábra. A vizsgált növényi kivonatok intracelluláris antioxidáns kapacitása DCFH-DA-val kezelt 3T3 (a) és HaCaT (b) sejtenyészetben. (Átlag ± szórás, 5 független kísérlet, $n=5 \cdot 4$ párhuzamos mérés minden koncentráció esetén). Szignifikáns változás a vizes és etanolos kivonatok között (kétmintás T-teszt, $**p < 0,01$; $***p < 0,001$) [122]

A DCF festékkel ellentétben a rodaminszármazék fluoreszcens jelét az összes vizsgált növényi kivonat csökkentette. Az oxidáció során keletkező fluoreszcencia szignálban okozott 50%-os csökkenéshez tartozó gátló koncentráció értékeit a 21. ábra mutatja. A DCF jeléhez hasonlóan a legnagyobb mértékben a fukszia fajok kivonatai (etanolos és vizes egyaránt) gátolták a rodamin fluoreszcencia intenzitását. Noha az *A. vulneraria* etanolos és vizes kivonatai számszerűsíthető eredményt adtak mindkét sejtvonal esetében, azonban a vizes frakció csak gyengén hatott.

Mindkét alkalmazott fluorogén riporter molekula érzékeny a peroxil gyökökre, hasonló oxidációs mechanizmusokkal rendelkeznek, ezért nem meglepő, hogy a DHR és a DCFH hasonló aktivitást mutatott a növényi kivonatok jelenlétében [173].

A vizsgált növényeinkre vonatkozóan nem találtunk korábbi tudományos publikációkat azok ROS semlegesítő hatásairól DHR123 vagy DCFH festéket felhasználva, ezért hatóanyagtartalmuk alapján hasonlítottuk össze eredményeinket az irodalmi forrásokkal.

A nem enzimatis TAC módszerekhez hasonlóan a fukszia fajok erős antioxidáns hatását antocianintartalmuk okozhatta. Az antocianinok közvetlen szabad gyök megkötő tulajdonsággal rendelkeznek a flavonoid molekula hidrogén (elektron) donor (átadás) képességének köszönhetően [83,214,216].



21. ábra. A vizsgált növényi kivonatok intracelluláris antioxidáns kapacitása DHR123 -val kezelt 3T3 (a) és HaCaT (b) sejtenyészetben. (Átlag ± szórás, 5 független kísérlet, $n=5*4$ párhuzamos mérés minden koncentráció esetén). Szignifikáns változás a vizes és etanolos kivonatok között (kétmintás T-teszt, $**p<0,01$; $***p<0,001$) [122]

V.8. Az *in vitro* migrációs teszt eredményei

Az etanolos kivonatok fibroblasztok és keratinociták migrációjára gyakorolt hatásának vizsgálatához steril szilikonbetétekkel 24 lyukú tenyésztőlemezekon standardizált 500 µm széles sejtmentes terület hoztunk létre. A sejtmentes terület „benövését” 24 órán keresztül fáziskontraszt mikroszkóppal monitoroztuk a növényi kivonatok vagy a pozitív kontroll (PDGF-BB) jelenlétében vagy anélkül (Mellékletek, M12-15. ábra). Az AUC oszlopdiagramjait a 4 óránként vizsgált kumulatív záródási arányok (%) alapján számítottuk (Mellékletek, M16-19. ábra).

A migrációs tesztek során a kivonatoknak a nem toxikus dózisait alkalmaztuk, vagyis ahol a fibroblaszt és a keratinocita sejtek több mint 90%-os életképességet mutattak a lemezolvasó vizsgálattal, és a nekrotikus sejtek 4% alatt voltak az áramlási citométeres vizsgálatban.

A pozitív kontrollként alkalmazott PDGF-BB 15 ng/ml koncentrációban stimuláló hatással volt mindkét sejtvonal migrációjára (3T3 sejteknél $117,05 \pm 6,72\%$, míg HaCaT sejteken $115,16 \pm 8,26\%$), összehasonlítva a kontroll sejtekkel (22. ábra). Az összes növényi minta esetében figyelemre méltó megfigyelés volt, hogy a kevésbé koncentrált kivonatok

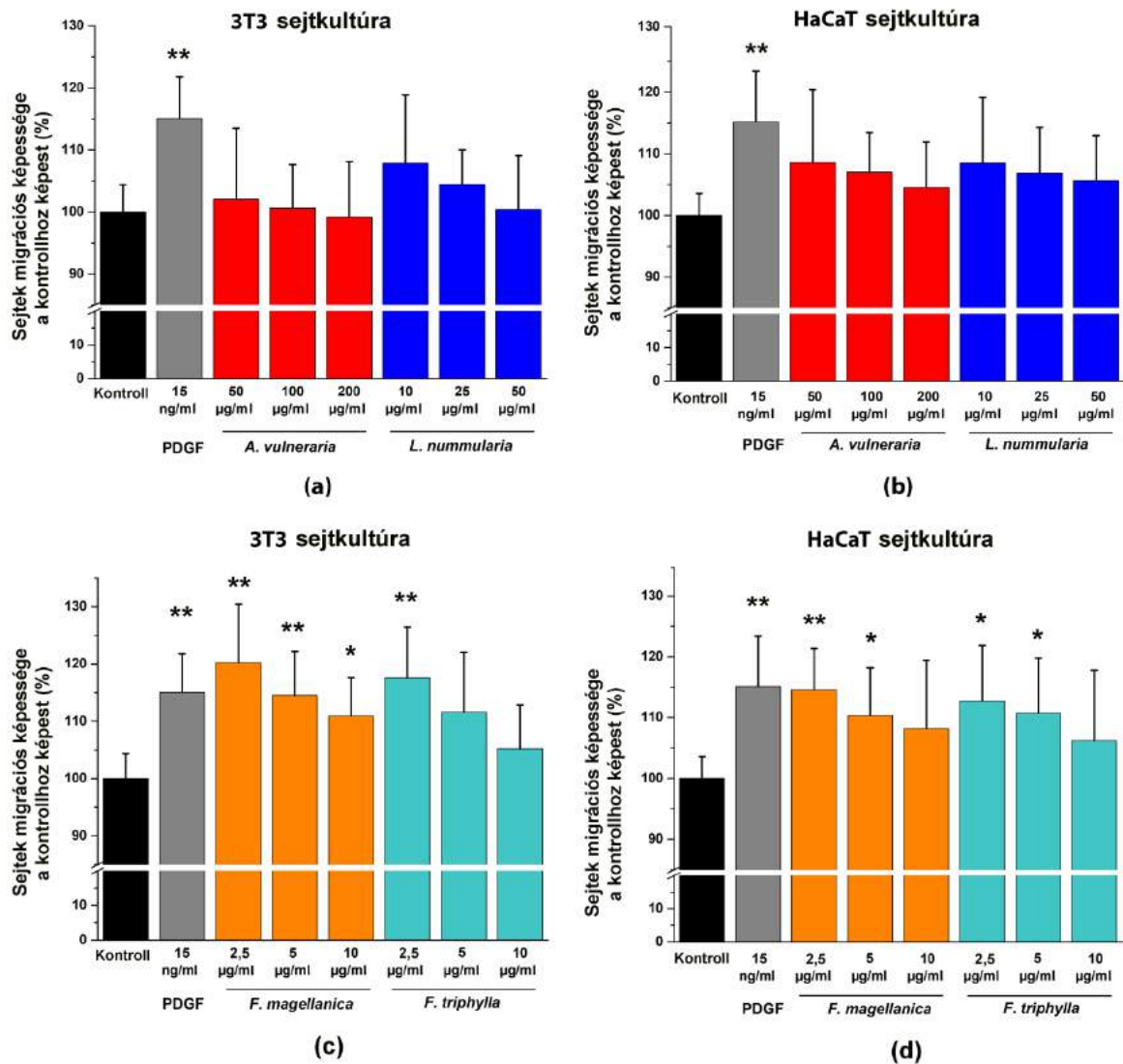
okozták a leghatékonyabb stimulációt a sejtvándorlásban a magasabb koncentrációjú kivonatokhoz képest.

A vizsgált négy növény közül az *A. vulneraria* fejtette ki a legenyhébb stimuláló hatást, ugyanis 50 µg/ml alkalmazott koncentráció mellett a 3T3 sejtekben $102,08 \pm 11,18\%$ (22. ábra, a), míg HaCaT sejteken $108,57 \pm 10,92\%$ emelkedést okozott (22. ábra, b). A *L. nummularia* nem mutatott szignifikáns migrációs hatást egyik sejtvonal esetében sem.

Fokozott migrációt figyeltünk meg a *F. magellanica* és *F. triphylla* kezelt sejtekben, összehasonlítva a kezeletlen sejtekkel. A 2 fukszia faj közül a *F. magellanica* volt a leginkább migrációt serkentő hatású mindkét sejtvonalon, ugyanis 2,5 µg/ml koncentrációban a záródási arány $120,2 \pm 10,17\%$ volt a 3T3 sejteken (22. ábra, a) és $114,61 \pm 3,72$ a HaCaT sejteken (22. ábra, b).

A sejtes alapú sebgyógyulás vizsgálatoknál fontos megkülönböztetni az osztódást és a vándorlást, mivel a sejtek általában nincsenek szinkronban. Ezért egyes szerzők a mitomicin C DNS szintézis gátló előkezelést alkalmazzák a migráció követésére, ha hosszabb (48 órás) inkubációs időt alkalmaznak, mivel az hosszabb, mint a sejtek generációs ciklusa [217]. Tesztjeink során nem alkalmaztuk ezt a vegyületet, mert inkubációs időnk csak 24 óra volt, és a szaporodási képesség ezen a rövid időn belül minimális. A HaCaT sejtenyészet egy humán keratinocita sejtvonal, amelynek megduplázódási ideje körülbelül 24 óra. A korai passzálásokban (2–8 passzálás szám) $36,2 \pm 1,5$ óra, míg a késői passzálásokban (10–16 passzálás szám) $24 \pm 0,6$ óra [218]. A 3T3 egér fibroblaszt sejtek megduplázódása 20–26 óra [219].

A növényeinkre vonatkozóan nem találtunk korábban elvégzett tudományos publikációkat biológiai hatásuk vizsgálatáról, különös tekintettel a sejtvándorlásra. Viszont irodalmi adatok bizonyítják, hogy a fukszia fajokban nagy mennyiségben lévő antocianinok a fibroblasztok és a keratinociták migrációjának fokozásával serkentik a sebgyógyulást [44,220]. Továbbá a fukszia fajokban mért hidroxibenzoészav-származékok (például a galluszsav a *F. magellanica* kivonatában vagy az ellágsav mindkét fukszia kivonatában) növelik a keratinociták és a fibroblasztok migrációját [61].



22. ábra. *A. vulneraria* (a, b), *L. nummularia* (a, b) *F. magellanica* (c, d) és *F. triphylla* (c, d) 50%-os (v/v) etanolos kivonatainak time-lapse alapú összehasonlító képalkotó elemzése 24 órán keresztül 3T3 (a, c) és HaCaT (b, d) monolayer tenyészetek „sebzaródási” képességére. (Átlag ± szórás, 3 független kísérlet, $n=3 \times 3$ párhuzamos mérés minden koncentráció esetén).

Szignifikáns változás a kezeletlen kontrollhoz képest, egyutas Anova-teszt * $p < 0,05$;

** $p < 0,01$ [122]

V.9. Jelátviteli folyamatok eredményei western blot technikával

V.9.1. A gyulladáscsökkentő hatás jelátviteli vizsgálata fehérjeszinten

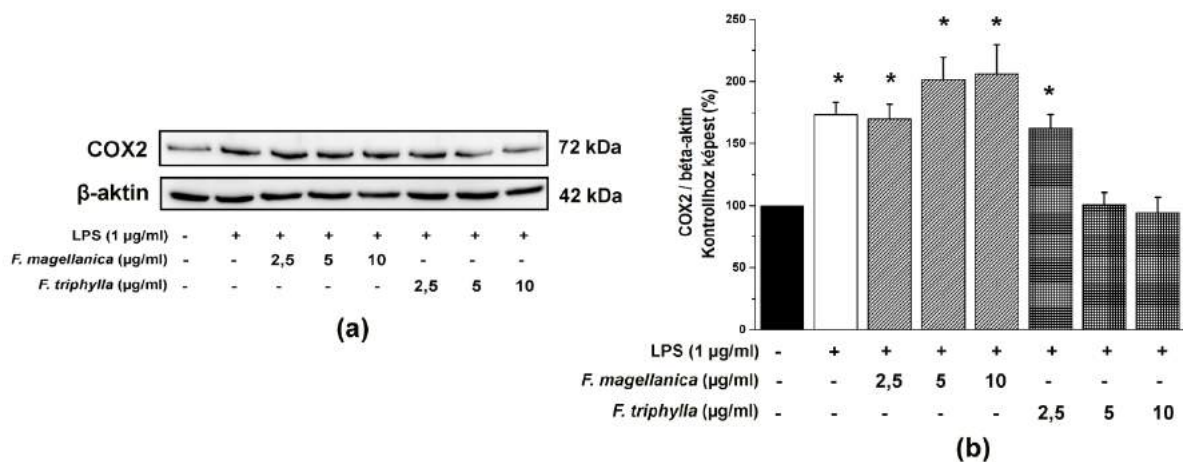
A gyulladós folyamat során az LPS vagy citokin stimuláció által indukált COX2 szintetizálja az arachidonsavból a prosztaglandinokat, amelyek közül a PGE2 kiemelkedő szereppel bír a gyulladás és a láz fokozásában. Ezért a COX2 gátlása kulcsfontosságú a gyulladáscsökkentő hatás vizsgálatához [221]. Ehhez a HaCaT sejteket 1 µg/ml LPS és a fukszia kivonatokkal együtt kezeltük 24 órán keresztül. Amint a 23. ábrán látható, a *F.*

triphylla kezelés dózis függően gátolta a COX2 expresszióját fehérjeszinten, összehasonlítva az LPS kezelt pozitív kontrollal ($173,26 \pm 9,92\%$). Továbbá a növény legtöményebb koncentrációja (10 $\mu\text{g/ml}$) elérte a kezeletlen, gyulladást nem indukált sejtek alapszintjét is ($94,40 \pm 2,32\%$). Azonban a *F. magellanica* az LPS kezeléshez képest nem hogy csökkentette, hanem koncentráció-függően fokozta a gyulladást a COX2 fehérje szint növelésével. A legtöményebb, 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban $205,95 \pm 23,79\%$ expresszió növekedést tapasztaltunk.

Mivel a tesztelt növényfajokra vonatkozóan nem találtunk korábbi adatokat az általunk vizsgált jelátviteli folyamatokra gyakorolt hatásokról, ezért hatóanyagtartalmuk alapján hasonlítottuk össze a kapott western blot eredményeinket az irodalmi adatokkal. Mindkét fukszia faj etanolos kivonatában nagy mennyiségben tudtunk kimutatni antocianinokat (lásd. IV.3 alfejezet), ezért hatásukat elsősorban azokhoz köthetjük. Az antocianinok képesek voltak *in vitro* gátolni a COX2, a NF- κ B és a különféle interleukinek mRNS és/vagy fehérje expressziójának szintjét több sejttípusban [83,222-224]. Az aszpirinnel összehasonlítva a cianidin jelentősebb gyulladáscsökkentő hatással bír, ugyanis képes volt csökkenteni a COX1 és a COX2 aktivitást 52, illetve 74%-kal [225]. Továbbá kimutatták, hogy a cianidin mellett a delfinidin és petunidin is gátolhatja a COX2 expressziót, míg a pelargonidin, peonidin és malvidin nem [226]. Az eredményeink ellentétesek az irodalmi adatokkal, ugyanis a *F. magellanica* kivonata fokozta a COX2 fehérje szintet annak ellenére, hogy cianidin-származékot tudtunk belőle kimutatni. Mindkét fukszia fajból peonidin-származékot izoláltunk, ami nem gátolja a COX2-t és nem is lehet felelős a fuksziákra kapott eltérő COX2 expressziós tendenciáért. Több antocianint (III. és VIII. vegyület, lásd. M1 táblázat a „Mellékletek” részben) megfelelő irodalmi források hiányában nem tudtunk pontosan azonosítani a *F. triphylla* etanolos kivonatában, amelyek esetleg csökkentették a COX2 expressziót.

Összehasonlítva a kapott immunoblot adatainkat az analitikai eredményeinkkel, további különbség a két fukszia faj között, amely magyarázhatja az eltérő COX2 expressziós szinteket, az ellágsav és a kvercetin-galloil-hexozid tartalmuk, amelyek négyszer nagyobb mennyiségben fordulnak elő a *F. triphylla* etanolos kivonatában, mint a *F. magellanica* etanolos extraktumában. Az ellágsav bizonyítottan gátolja az LPS indukálta COX2 fehérje expresszióját monocitákban, miközben nincs hatással a COX1 fehérjére [227]. Továbbá a kvercetin-galloil-hexozidhoz hasonló glikozidos komponens, a kvercetin-galloil-glükopiranozid is gátolja makrofágokban a COX2 fehérjeszintet [228]. Itt a galloilcsoport

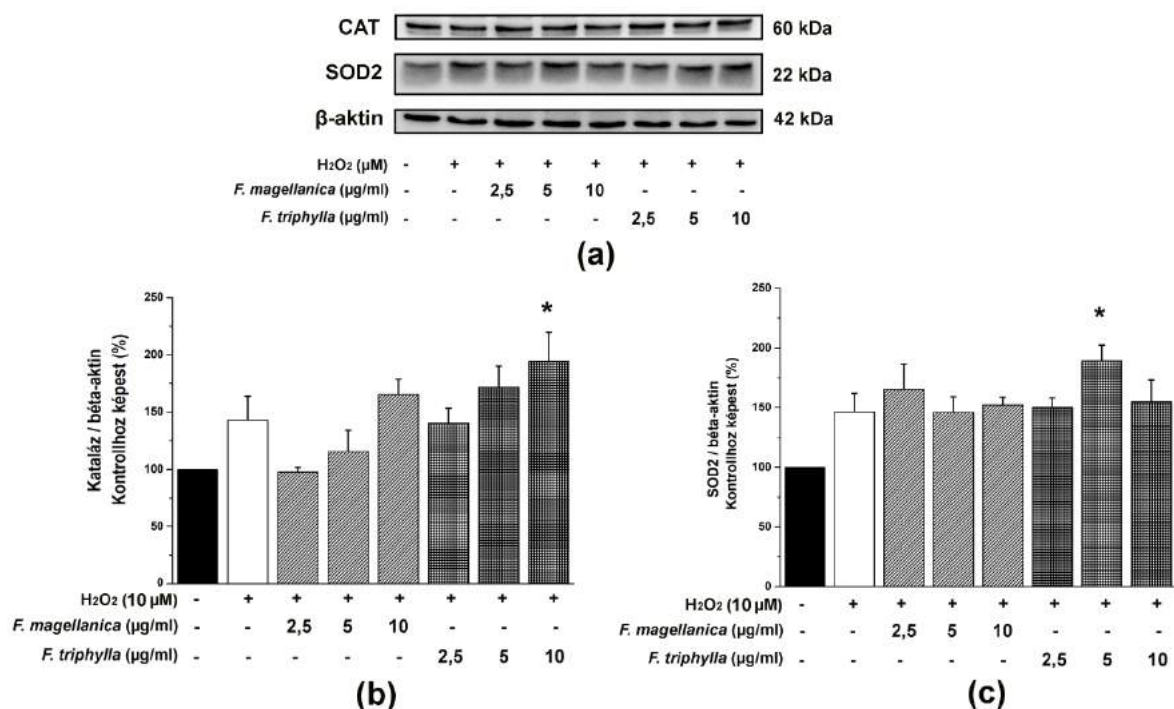
elhelyezkedése a cukorrésznel az, amely jelentősen gátolja a gyulladást a COX2 fehérjeszint csökkentésével [229].



23. ábra. A *F. magellanica* és a *F. triphylla* szabályozza a COX2 expresszióját az epidermális keratinocitákban (a). Western blot COX2 expressziója keratinocitákban 24 órás LPS és *F. magellanica* vagy *F. triphylla* etanolos kivonataival különböző koncentrációban történő kezelést követően (b) Az összes fehérjét szemi-quantifikáltuk a Syngene GeneTools szoftver segítségével és normalizáltuk a béta-aktin szintjére. (Átlag \pm SEM, 5 független kísérlet) *: szignifikáns változás a kontrollhoz képest, egyutas Anova-teszt * $p < 0,05$. Nem publikált eredmények

V.9.2. Az antioxidáns hatás jelátviteli vizsgálata fehérjeszinten

A két antioxidáns enzim (CAT és SOD2) fehérje szintű expressziójának vizsgálatához a HaCaT sejteket 10 μ M H₂O₂ és fukszia kivonatokkal együtt kezeltük 24 órán keresztül. Mind a *F. magellanica*, mind a *F. triphylla* fokozta a CAT és SOD2 fehérjék szintjét a kezeletlen kontroll sejtekhez képest (24. ábra). A CAT esetében a növényi kivonatok legtöményebb, 10 μ g/ml koncentrációja emelte a legnagyobb mértékben a fehérjeexpressziót, ugyanis a H₂O₂-nél is magasabb jelet detektáltunk. Míg a H₂O₂ kezelés 143,03 \pm 20,80%-ban fokozta a fehérjeszintet, addig a *F. magellanica* kezelés 165,44 \pm 13,10%, a *F. triphylla* 194,24 \pm 25,13 % intenzitásnövekedést okozott a sejtekben (24. ábra). A SOD2 szintjében is erőteljesebb hatást váltottak ki a fukszia kivonatok, mint önmagában a H₂O₂ (146,28 \pm 15,60%) kezelés. A *F. magellanica* esetében a leghígabb, 2,5 μ g/ml koncentrációjú kivonat 165,29 \pm 21,02%, a *F. triphylla* 5 μ g/ml koncentrációban 189,08 \pm 13,19% expressziós szintemelkedést váltott ki a HaCaT sejtekben a kezeletlen kontroll sejtekhez képest (24. ábra). Az antioxidáns hatású fehérjék szintjében történő változást a növények kivonataiban előforduló antocianinek okozhatták, amelyek bizonyítottan képesek fokozni az antioxidáns enzimek (CAT, SOD2, SOD1) expresszióját fehérje szinten [230].



24. ábra. A *F. magellanica* és a *F. triphylla* szabályozza a CAT és SOD2 expresszióját az epidermális keratinocitákban (a). Western blot CAT és SOD2 expressziója keratinocitákban 24 órás H₂O és *F. magellanica* vagy *F. triphylla* etanolos kivonataival különböző koncentrációban történő kezelést követően (b, c) Az összes fehérjét szemi-quantifikáltuk a Syngene GeneTools szoftver segítségével és normalizáltuk a béta-aktin szintjére. (Átlag ± SEM, 5 független kísérlet) *: szignifikáns változás a kontrollhoz képest, Egyutas Anova-teszt * $p < 0,05$. Nem publikált eredmények

V.9.3. A migrációt, proliferációt és sejttúlélést serkentő hatások jelátviteli vizsgálata fehérjeszinten

Annak meghatározására, hogy a fukszia fajok feltehetően mely jelátviteli utakon keresztül vesznek részt a humán keratinocita sejtek túlélésében, migrációjában és proliferációjában, ezáltal a sejtek szabályozta sebgyógyulásban, megvizsgáltuk a p38, PI3K/Akt és Erk/MAPK fehérjék expresszióját és foszforilációját.

Mind a *F. magellanica*, mind a *F. triphylla* etanolos kivonata dózis függően megnövelte a foszforilált p38 fehérje aktivitását, összehasonlítva a kezeletlen kontroll sejtekkel (25. ábra). A legnagyobb emelkedést a legtöményebb koncentrációk (10 μg/ml) okozták mindkét növényi minta esetén (*F. magellanica* 134,39 ± 22,68%, a *F. triphylla* 146,61 ± 25,86% emelkedést okozott a kontrollhoz képest).

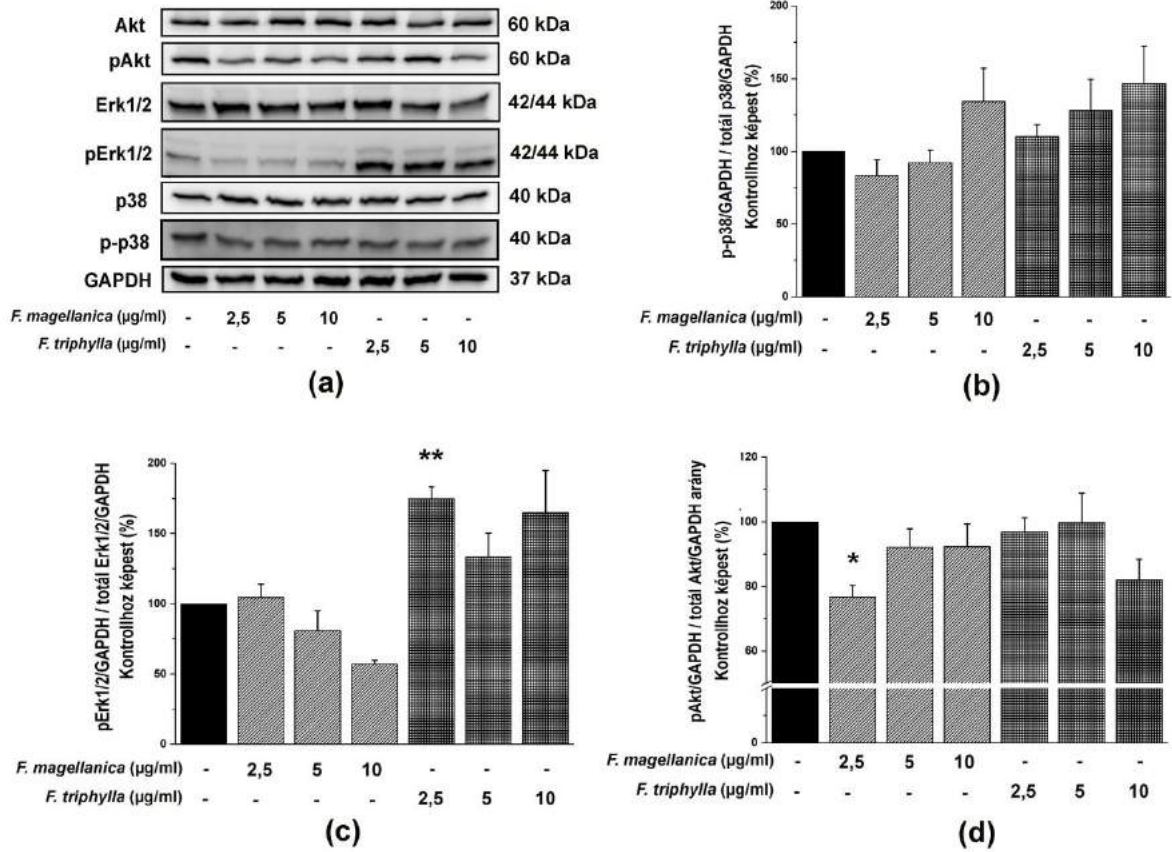
Bár a p38/MAPK jelátviteli út a sebgyógyulásban még nem teljesen tisztázott, nemrégiben megjelent tanulmányok azt sugallják, hogy részt vesz a keratinociták sebzési területre történő migrációjának irányításában [57,59]. Mivel a fuksziák kivonatai fokozták a

p38 fehérje foszforilációját, feltételezzük, hogy a keratinociták migrációja és a seb bezáródása a p38/MAPK útvonal aktivitásával áll kapcsolatban.

Érdekes eredményt kaptunk az Erk/MAPK útvonal vizsgálata során, ugyanis míg a *F. magellanica* koncentrációfüggően csökkentette az Erk1/2 foszforilációját ($56,75 \pm 2,84\%$ a legtöményebb $10 \mu\text{g/ml}$ koncentrációban), addig a *F. triphylla* bár nem dózis függően, de fokozta a foszforilált fehérjeexpressziót ($174,80 \pm 8,34\%$ emelkedést mértünk a leghígabb $2,5 \mu\text{g/ml}$ koncentrációval kezelt sejtekben) (25. ábra).

A kapott eredményeink ellentétesek az irodalmi adatokkal, ugyanis a *F. magellanica* kivonatában előforduló galluszsav aktiválja az Erk1/2 jelátviteli útvonalat humán keratinocitákban és fibroblasztokban egyaránt [61], azonban mi csökkenést figyeltünk meg.

A PI3K/Akt jelátviteli út fokozásában nem vesznek részt a fuksziák kivonatai, ugyanis nem emelték meg a foszforilált Akt szintjét, azonban a *F. magellanica* leghígabb extraktuma ($2,5 \mu\text{g/ml}$), valamint a *F. triphylla* legtöményebb kivonata inkább csökkentette azt (25. ábra). A növényekben előforduló fő hatóanyagokra vonatkozóan nem találtunk korábbi tudományos eredményeket a keratinocita sejtekre gyakorolt hatások vizsgálatáról, különös tekintettel a PI3K/Akt útvonalra. Viszont eredményeinket irodalmi adatok alátámasztják oly módon, hogy az antocianinok képesek gátolni a PI3K/Akt útvonalat szintén a bőrben tipikusan előforduló sejttípusban (HUVEC endotél sejtekben) [65]. Továbbá bizonyítottan az ellágsav is gátolja a humán endotél sejtek migrációját [231].



25. ábra. A *F. magellanica* és a *F. triphylla* szabályozza a p38, Akt és az Erk1/2 expresszióját az epidermális keratinocitákban (a). Western blot p38, p-p38, Erk1/2, p-Erk1/2 Akt és pAkt, expressziója keratinocitákban 24 órás *F. magellanica* vagy *F. triphylla* etanolos kivonataival különböző koncentrációban történő kezelést követően (b – d) Az összes fehérjét szemi-kvantifikáltuk a Syngene GeneTools szoftver segítségével és normalizáltuk a GAPDH szintjére. Ezt követően a foszforilált fehérjék normalizált értékeit elosztottuk a total fehérjék normalizált értékeivel. (Átlag ± SEM, 5 független kísérlet). Szignifikáns változás a kezeletlen kontrollhoz képest, egyutas Anova-teszt * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Nem publikált eredmények

VI. ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Annak érdekében, hogy ugyanazon kitapadó sejtmintről egyszerre több paramétert tudjunk meghatározni, kidolgoztunk egy borát pufferes, detergenst tartalmazó feltárás lemezolvasó készülék alkalmazásával, amelynek során egy mintről egy lépéses feltárással 4 paramétert tudunk egymást követően megvizsgálni (sejten belüli ATP-, GFP-, nukleinsav- és összfehérje tartalom). A lizáló puffert kiegészítve 20 mM Na₂EDTA-val, stabilizálódik az ATP-szint a feltárást követően legalább 30 percig
2. Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy az expresszált GFP fluoreszcencia intenzitást a lemezolvasón történő, gyors sejtfeltáró, új módszerünkkel mennyiségileg képesek vagyunk meghatározni és összevetni más viabilitás jelzőkkel. Azonban eredményeink azt sugallják, hogy a GFP fluoreszcencia csökkenése nem mindig korrelál az intracelluláris ATP tartalommal. Ennek ellenére az expresszált GFP fluoreszcencia intenzitásának meghatározása alkalmazható a sejtek életképességi markereként, de kizárólag többparaméteres vizsgálatok során, valamint legalább egy anyagcsere marker mellett kell figyelembe venni, hogy a legmegbízhatóbb információt kapjuk az életképesség vagy citotoxicitás tesztekénél.
3. Kísérleteink során igazoltuk, hogy a sejtek életképességének becslése egyetlen viabilitás faktor meghatározásával (pl. enzimaktivitás mérése rezazurin módszerrel) félrevezető lehet. Ugyanis egyes β -ciklodextrinek (BCD, HPBCD, DIMEB) stabil komplexeket képeznek rezazurinnal és rezorufinnal, befolyásolva a rezorufin fluoreszcens jelét és feltehetőleg a rezazurin celluláris felvételének ütemét. Eredményeik rámutatnak, hogy a különböző CD-ek komplex módon képesek befolyásolni a rezazurin viabilitás teszt eredményeit. Így azokban a kísérletekben, melyek során CD-eket is alkalmaznak, a rezazurin-alapú vizsgálatok megbízhatósága erősen kétségesnek tűnik.
4. Az etnofarmakobotanikai gyűjtések eredményei alapján elmondható, hogy még napjainkban is fontos szerepet játszanak az erdélyi népgyógyászatban a gyógynövényekhez kapcsolódó adatok és tudáselemek, amelyek elsősorban az idősök körében maradtak fenn.
5. Az *A. vulneraria* mintájában többségében flavonol-glikozidok fordulnak elő. Ezzel szemben a fukszia fajok általános flavonol-vegyületek mellett különféle fahéjsav- és benzoésav-származékokat, például kávésav, ellágsav és galluszsav-származékokat,

kempferol- és kvercetin-galloil-glikozidokat tartalmaznak. Ezek közül az ellágsav és a kvercetin-galloil-hexozid négyszer nagyobb mennyiségben fordul elő a *F. triphylla* etanolos kivonatában, mint a *F. magellanica* etanolos esetében. A *F. magellanica* és *F. triphylla* leveleiben számos antocianin komponens is előfordul, például cianidin és peonidin származékok. A *L. nummularia* levélkivonataiban a fő flavonoidok miricetin-származékok voltak.

6. A *F. magellanica* és *F. triphylla* etanolos kivonata 50 µg/ml koncentráció alatt nem okozott életképesség csökkenést, míg a vizes kivonataik esetében ez 120 µg/ml volt. A *L. nummularia* etanolos kivonata maximum 250 µg/ml koncentrációban volt alkalmazható, míg a vizes kivonat 3000 µg/ml koncentrációban sem okozott jelentős sejtkárosító hatást. A legkevésbé citotoxikus növény az *A. vulneraria* volt, ugyanis etanolos kivonata 500 µg/ml koncentrációban, vizes kivonata pedig 4000 µg/ml dózisban sem váltott ki életképesség csökkenést a 3T3 és HaCaT sejtekben.

Áramlási citométeren a növények etanolos kivonatait vizsgáltuk. A *F. magellanica* és *F. triphylla* kivonata 10 µg/ml koncentrációban, a *L. nummularia* 50 µg/ml, az *A. vulneraria* 200 µg/ml koncentráció alatt biztosan nem váltott ki citotoxikus hatást, ugyanis a nekrotikusan elhalt sejtek aránya 4% alatt volt mindkét sejtvonalban.

7. Munkánk során teszteltük a 4 növényfaj etanolos és vizes kivonatának antimikrobás hatását, amelyek közül a fukszia fajok kivonatai jelentős antimikrobás hatást mutattak a *P. aeruginosa*, a *S. aureus*, a *B. subtilis* és a *S. pyogenes* baktériumtörzsek esetében. A leggyengébb antimikrobás hatást az *A. vulneraria* kivonatai esetében mértük.

A fukszia fajok etanolos és vizes kivonatainak antimikrobiális MIC₈₀ koncentráció értékei alacsonyabbak voltak az antibakteriális vizsgálatban, mint a fibroblasztok és a keratinociták esetében mért dózis-hatás citotoxicitás értékei. Ezért arra a következtetésre juthatunk, hogy a tesztelt fukszia fajok kivonatai hatékony komponensekkel rendelkezhetnek új antibakteriális és sebgyógyító stimuláló szerek elkészítéséhez.

8. Egységesen a fukszia fajok szembetűnően magasabb TAC értékeket, valamint sejten belüli ROS semlegesítő hatást mutattak (*F. triphylla* > *F. magellanica* > *L. nummularia* > *A. vulneraria*).

9. A vizsgált növények közül a *F. magellanica* és *F. triphylla* mutatott a PDGF-BB pozitív kontrollhoz hasonló sejtmigrációt serkentő hatást 3T3 valamint HaCaT sejtvonalon.

10. A COX2 enzim gátlását csak a *F. triphylla* kivonata esetén tapasztaltuk, mely gyakorlatilag a kezeletlen kontroll értékéig csökkentette annak szintjét, míg a *F. magellanica* dózis függően fokozta a fehérje expresszióját, meghaladva az LPS pozitív kontroll hatását is.

A két antioxidáns enzim (CAT és SOD2) fehérjeszintű kifejeződésének vizsgálata során mindkét fukszia etanolos kivonata serkentette azok expresszióját. A CAT fehérje esetén dóziszfüggő emelkedést figyeltünk meg.

A fuksziák kivonatai szabályozzák a MAPK kaszkád két útvonalát is, egyrészt a p38 fehérje foszforilációja, másrészt az Erk1/2 fehérjék foszforilációja révén. Azonban míg a p38 esetén mindkét kivonat emelte a foszforilált fehérje szintjét, addig az Erk1/2 esetében a *F. magellanica* csökkentette, míg a *F. triphylla* kivonata növelte azt. A PI3K/Akt jelátviteli út fokozásában nem vesznek részt a fukszia fajok kivonatai.

Általánosan elmondható, hogy a vizsgált 4 növényfaj közül a *F. magellanica* és a *F. triphylla* kiemelkedő biológiai hatással rendelkezik, elsősorban azok antocianin- valamint fenolsav-tartalmuk révén, amelyek felelősek lehetnek a sebgyógyulásban betöltött hatékony szerepükért. Továbbá a vizsgált fajok előzetes eredményei alátámasztják, hogy számos népgyógyászatban alkalmazott és további vizsgálatra érdemes taxon vár további fitokémiai analízisre és biológiai hatásvizsgálatokra, amelyek a napjainkban alkalmazott fitoterápia szempontjából is jelentős eredményeket hozhatnak.

Eredményeink többsége újnak tekinthetők, mivel tudomásunk szerint korábban nem végeztek ezen növények kivonataival hasonló vizsgálatokat.

VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni hálámat mindazoknak, akik segítségével PhD munkám nem valósulhatott volna meg.

Szeretném megköszönni az iránymutatást témavezetőmnek **Prof. Dr. Kőszegi Tamásnak**, aki kezdetektől fogva támogatott és kiemelkedő szakmai tudásával és tapasztalatával hozzásegített munkám elkészüléséhez. Hálával tartozom, amiért mindvégig támogatta a gyógynövények és a sejtes vizsgálatok iránti érdeklődésemet, mellette elsajátíthattam a legfontosabb sejtes módszerek alapjait.

Köszönöm **Dr. Papp Nórának**, hogy bevezetett a gyógynövénykutatás világába, valamint segítségével az erdélyi terepmunkában is részt vehettem. Hálásan köszönöm nélkülözhetetlen javaslatait és a közösen végzett munkákat, amelyek alapvetően hozzájárultak a dolgozat, illetve a tudományos közlemények születéséhez.

Szeretném megköszönni a támogatást **Dr. Poór Miklósnak**, akinek segítségével a toxinokról és ciklodextrinekről alkotott tudásom nagymértékben bővült. Köszönöm értékes javaslatait és a közös munkákat, amelyekkel a dolgozatom szakmai szempontból értékesebb lett, valamint tudományos publikációk megjelenését is lehetővé tette.

Kiemelt köszönettel tartozom **Temesfői Viktóriának** az áramlási citometriás vizsgálatok kivitelezésében és értékelésében nyújtott segítségével. Köszönöm, hogy mindvégig biztatott és mellettem állt. Ezen kívül köszönöm, hogy barátként is mindig számíthattam rá.

Köszönöm **Das Souravnak** a mikrobiológiai vizsgálatokban nyújtott segítségét.

A Laboratóriumi Medicina Intézet igazgatójának, **Prof. Dr. Miseta Attilának** és a Szentágothai Kutatóközpont korábbi elnökének, **Prof. Dr. Kovács L. Gábornak**, valamint jelenlegi elnökének, **Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának** is köszönettel tartozom, amiért lehetőséget biztosítottak vizsgálataim elvégzéséhez.

Köszönöm a Laboratóriumi Medicina Intézet minden dolgozójának a segítséget és a támogatást. Külön hálával tartozom **Györgyi Erzsébetnek**, aki megismertette velem a western blot laboratóriumi technikát, és nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a vizsgálatok elvégzéséhez.

Köszönöm **Dr. Alberti-Dér Ágnesnek** és **Tóth Csenge Annának** a kromatográfiás analízisek kivitelezésében és értékelésében nyújtott segítséget.

Köszönettel tartozom a vizsgálatban résztvevő valamennyi **erdélyi adatközlőnek**, akik hozzájárultak a jelen tudományos munka megszületéséhez.

Végül, de nem utolsósorban hálás szívvel köszönöm **Családomnak**, akik mindvégig biztattak, mellettem álltak és megértően támogattak tanulmányaim alatt. Külön köszönöm Édesanyámnak és Édesapámnak, hogy a biológiai pálya irányába orientáltak. Hálával tartozom Nagymamám szerető gondoskodásáért és a lelkes biztatásáért. Köszönöm Bátyám inspirációit, amelyek nélkül dolgozatom nem jöhetett volna létre. Nagyon köszönöm Vőlegényemnek a szeretetet, továbbá hálával tartozom, amiért kiemelkedő türelemmel viselt minden nehézséget, amin keresztülmentem. Köszönöm, hogy nem csak lelkileg, de informatikai tudásával is végig támogatott.

A dolgozatot Édesapámnak, néhai **Csepregi Jánosnak** ajánlom, aki mindig nagy szeretettel és érdeklődéssel hallgatta az egyetemi alapképzésem alatt lelkes kutatói beszámolóimat.

Munkám az alábbi pénzügyi támogatások segítségével valósult meg:

Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-18-3-I kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Program

K127944 számú Országos Tudományos Kutatási Alapprogram (Dr. Papp Nóra)

KA-2018-17 (Prof. Dr. Kószegi Tamás)

EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009

VIII. IRODALOMJEGYZÉK

1. Kelly, K. *The history of medicine*; New York, 2009.
2. Petrovska, B.B. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews* **2012**, *6*, 1-5, doi:10.4103/0973-7847.95849.
3. Wiart, C. *Ethnopharmacology of medicinal plants: Asia and the Pacific*; Springer Science & Business Media: 2007.
4. Tucakov, J. Healing with plants—phytotherapy. *Beograd: Culture* **1971**, 180-190.
5. Glesinger, L. Medicine through centuries. *Zagreb: Zora* **1954**, *1*, 21-38.
6. Tucakov, J. Pharmacognosy. *Beograd: Academic books* **1964**, 11-30.
7. Toplak Galle, K. Domestic medicinal plants. *Zagreb: Mozaic book* **2005**, 60-61.
8. Bojadzievski, P. The health services in Bitola through the centuries. *Bitola: Society of science and art* **1992**, *1992*, 15-27.
9. Dervendzi, V. Contemporary treatment with medicinal plants. *Skopje: Tabernakul* **1992**, 5-43.
10. Lukic, P. Pharmacognosy. *Beograd: SSO faculty of pharmacy* **1985**, 8-22.
11. Khan, M.S.A.; Ahmad, I.; Chattopadhyay, D. *New Look to Phytomedicine, Advancements in Herbal Products as Novel Drug Leads*; Academic Press: 2019.
12. Korkina, L.; De Luca, C.; Pastore, S. Plant polyphenols and human skin: friends or foes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2012**, *1259*, 77-86, doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06510.x.
13. Lencsés, G. *Ars Medica 1577*; Budapest, 2000.
14. Pelczéder, K. *Lencsés György „Orvosi könyv (Ars medica)” című munkája növényneveinek a vizsgálata*; Nemzetközi Magyarorságtudományi Társaság: Debrecen–Budapest, 2007.
15. Melius, J.P. *Herbarium*; Kolozsvár, 1578.
16. Holló, G.; Rác, G. *Plante folosite in medicina populară din Bazinul superior al Trotusului (Ghimes)*; Plantele medicinale din flora spontană al Bazinului Ciuc. : Miercurea Ciuc, 1968.
17. Rác, G.; Füzi, J. *Kovászna megye gyógynövényei* Árkosi Agronómusok Háza: Sepsiszentgyörgy, 1973.
18. Gub, J. *Adatok a Nagy-Homoród és a Nagy-Küküllő közötti terület népi növényismeretéhez* Néprajzi Látóhatár 1993.
19. Gub, J. *Erdő-mező növényei a Sóvidéken* Firtos Művelődési Egylet, : Korond, 1996.
20. Gub, J. *Népi növényismeret a Nagy-Homoród mentén* Magyar Köztársaság Kulturális Intézete: Bukarest, 2005.
21. Lazarus, G.S.; Cooper, D.M.; Knighton, D.R.; Margolis, D.J.; Pecoraro, R.E.; Rodeheaver, G.; Robson, M.C. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Archives of dermatology* **1994**, *130*, 489-493.

22. Kawasumi, A.; Sagawa, N.; Hayashi, S.; Yokoyama, H.; Tamura, K. Wound healing in mammals and amphibians: toward limb regeneration in mammals. *Current topics in microbiology and immunology* **2013**, *367*, 33-49, doi:10.1007/82_2012_305.
23. Gonzalez, A.C.; Costa, T.F.; Andrade, Z.A.; Medrado, A.R. Wound healing - A literature review. *Anais brasileiros de dermatologia* **2016**, *91*, 614-620, doi:10.1590/abd1806-4841.20164741.
24. Jaric, S.; Kostic, O.; Mataruga, Z.; Pavlovic, D.; Pavlovic, M.; Mitrovic, M.; Pavlovic, P. Traditional wound-healing plants used in the Balkan region (Southeast Europe). *Journal of ethnopharmacology* **2018**, *211*, 311-328, doi:10.1016/j.jep.2017.09.018.
25. Ghosh, P.K.; Gaba, A. Phyto-extracts in wound healing. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* **2013**, *16*, 760-820, doi:10.18433/j3831v.
26. Medrado, A.; Costa, T.; Prado, T.; Reis, S.; Andrade, Z. Phenotype characterization of pericytes during tissue repair following low-level laser therapy. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* **2010**, *26*, 192-197, doi:10.1111/j.1600-0781.2010.00521.x.
27. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*; Clarendon Press: Oxford, 2006.
28. Halliwell, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition reviews* **1997**, *55*, S44-49; discussion S49-52, doi:10.1111/j.1753-4887.1997.tb06100.x.
29. Dunnill, C.; Patton, T.; Brennan, J.; Barrett, J.; Dryden, M.; Cooke, J.; Leaper, D.; Georgopoulos, N.T. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International wound journal* **2017**, *14*, 89-96, doi:10.1111/iwj.12557.
30. Maqsood, S.; Benjakul, S. Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. *Food Chemistry* **2010**, *119*, 123-132.
31. Thilakarathna, S.H.; Rupasinghe, H.P. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients* **2013**, *5*, 3367-3387, doi:10.3390/nu5093367.
32. Shahidi, F.; Naczk, M. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*; CRC Press: 2004.
33. Aherne, S.A.; O'Brien, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* **2002**, *18*, 75-81, doi:10.1016/s0899-9007(01)00695-5.
34. Pan, M.H.; Lai, C.S.; Ho, C.T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food & function* **2010**, *1*, 15-31, doi:10.1039/c0fo00103a.
35. de Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W.M.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U.A. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of chromatography. A* **2006**, *1112*, 31-63, doi:10.1016/j.chroma.2006.01.019.
36. Vukics, V.; Guttman, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews* **2010**, *29*, 1-16, doi:10.1002/mas.20212.

37. Saibabu, V.; Fatima, Z.; Khan, L.A.; Hameed, S. Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acids. *Advances in pharmacological sciences* **2015**, *2015*, 823539, doi:10.1155/2015/823539.
38. de Córdova, M.L.F.; Medina, A.R. *Analytical Methods for Determination of Polyphenols in Beer*; Academic Press: 2014.
39. Santangelo, C.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Di Benedetto, R.; Filesi, C.; Masella, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali dell'Istituto superiore di sanita* **2007**, *43*, 394-405.
40. Middleton, E., Jr.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews* **2000**, *52*, 673-751.
41. Yoon, J.H.; Baek, S.J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei medical journal* **2005**, *46*, 585-596, doi:10.3349/ymj.2005.46.5.585.
42. Serafini, M.; Peluso, I.; Raguzzini, A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *The Proceedings of the Nutrition Society* **2010**, *69*, 273-278, doi:10.1017/S002966511000162X.
43. Li, X.; Li, Z.; Zheng, Z.; Liu, Y.; Ma, X. Unfractionated heparin ameliorates lipopolysaccharide-induced lung inflammation by downregulating nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Inflammation* **2013**, *36*, 1201-1208, doi:10.1007/s10753-013-9656-5.
44. Van de Velde, F.; Esposito, D.; Grace, M.H.; Pirovani, M.E.; Lila, M.A. Anti-inflammatory and wound healing properties of polyphenolic extracts from strawberry and blackberry fruits. *Food research international* **2019**, *121*, 453-462, doi:10.1016/j.foodres.2018.11.059.
45. Rathee, P.; Chaudhary, H.; Rathee, S.; Rathee, D.; Kumar, V.; Kohli, K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflammation & allergy drug targets* **2009**, *8*, 229-235, doi:10.2174/187152809788681029.
46. Lee, J.H.; Kim, G.H. Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. *Journal of food science* **2010**, *75*, H212-217, doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01755.x.
47. Ueda, H.; Yamazaki, C.; Yamazaki, M. A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity and inhibition of systemic tumor necrosis factor-alpha production. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2004**, *68*, 119-125, doi:10.1271/bbb.68.119.
48. Hwang, S.J.; Kim, Y.-W.; Park, Y.; Lee, H.-J.; Kim, K.-W. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflammation Research* **2014**, *63*, 81-90.
49. Chao, C.Y.; Mong, M.C.; Chan, K.C.; Yin, M.C. Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice. *Molecular nutrition & food research* **2010**, *54*, 388-395, doi:10.1002/mnfr.200900087.
50. da Cunha, F.M.; Duma, D.; Assreuy, J.; Buzzi, F.C.; Niero, R.; Campos, M.M.; Calixto, J.B. Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory

- properties. *Free radical research* **2004**, 38, 1241-1253, doi:10.1080/10715760400016139.
51. Pragasam, S.J.; Venkatesan, V.; Rasool, M. Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. *Inflammation* **2013**, 36, 169-176, doi:10.1007/s10753-012-9532-8.
 52. Guo, S.; Dipietro, L.A. Factors affecting wound healing. *Journal of dental research* **2010**, 89, 219-229, doi:10.1177/0022034509359125.
 53. Bolla, S.R.; Mohammed Al-Subaie, A.; Yousuf Al-Jindan, R.; Papayya Balakrishna, J.; Kanchi Ravi, P.; Veeraraghavan, V.P.; Arumugam Pillai, A.; Gollapalli, S.S.R.; Palpath Joseph, J.; Surapaneni, K.M. In vitro wound healing potency of methanolic leaf extract of *Aristolochia saccata* is possibly mediated by its stimulatory effect on collagen-1 expression. *Heliyon* **2019**, 5, e01648, doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01648.
 54. Mansuri, M.L.; Parihar, P.; Solanki, I.; Parihar, M.S. Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways. *Genes & nutrition* **2014**, 9, 400, doi:10.1007/s12263-014-0400-z.
 55. Hommes, D.W.; Peppelenbosch, M.P.; van Deventer, S.J. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* **2003**, 52, 144-151, doi:10.1136/gut.52.1.144.
 56. Muthusamy, V.; Piva, T.J. The UV response of the skin: a review of the MAPK, NFkappaB and TNFalpha signal transduction pathways. *Archives of dermatological research* **2010**, 302, 5-17, doi:10.1007/s00403-009-0994-y.
 57. Pereira Beserra, F.; Xue, M.; Maia, G.L.A.; Leite Rozza, A.; Helena Pellizzon, C.; Jackson, C.J. Lupeol, a Pentacyclic Triterpene, Promotes Migration, Wound Closure, and Contractile Effect In Vitro: Possible Involvement of PI3K/Akt and p38/ERK/MAPK Pathways. *Molecules* **2018**, 23, doi:10.3390/molecules23112819.
 58. Nishikai-Yan Shen, T.; Kanazawa, S.; Kado, M.; Okada, K.; Luo, L.; Hayashi, A.; Mizuno, H.; Tanaka, R. Interleukin-6 stimulates Akt and p38 MAPK phosphorylation and fibroblast migration in non-diabetic but not diabetic mice. *PloS one* **2017**, 12, e0178232, doi:10.1371/journal.pone.0178232.
 59. Loughlin, D.T.; Artlett, C.M. Modification of collagen by 3-deoxyglucosone alters wound healing through differential regulation of p38 MAP kinase. *PloS one* **2011**, 6, e18676, doi:10.1371/journal.pone.0018676.
 60. Lin, C.W.; Wu, M.J.; Liu, I.Y.; Su, J.D.; Yen, J.H. Neurotrophic and cytoprotective action of luteolin in PC12 cells through ERK-dependent induction of Nrf2-driven HO-1 expression. *Journal of agricultural and food chemistry* **2010**, 58, 4477-4486, doi:10.1021/jf904061x.
 61. Yang, D.J.; Moh, S.H.; Son, D.H.; You, S.; Kinyua, A.W.; Ko, C.M.; Song, M.; Yeo, J.; Choi, Y.H.; Kim, K.W. Gallic Acid Promotes Wound Healing in Normal and Hyperglucidic Conditions. *Molecules* **2016**, 21, doi:10.3390/molecules21070899.
 62. Yu, J.S.; Cui, W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development* **2016**, 143, 3050-3060, doi:10.1242/dev.137075.

63. Sasaki, A.T.; Chun, C.; Takeda, K.; Firtel, R.A. Localized Ras signaling at the leading edge regulates PI3K, cell polarity, and directional cell movement. *The Journal of cell biology* **2004**, *167*, 505-518, doi:10.1083/jcb.200406177.
64. Sepe, L.; Ferrari, M.C.; Cantarella, C.; Fioretti, F.; Paoella, G. Ras activated ERK and PI3K pathways differentially affect directional movement of cultured fibroblasts. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **2013**, *31*, 123-142, doi:10.1159/000343355.
65. Tsakiroglou, P.; VandenAkker, N.E.; Del Bo, C.; Riso, P.; Klimis-Zacas, D. Role of Berry Anthocyanins and Phenolic Acids on Cell Migration and Angiogenesis: An Updated Overview. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:10.3390/nu11051075.
66. Zhang, Y.; Liu, D. Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function. *European journal of pharmacology* **2011**, *670*, 325-332, doi:10.1016/j.ejphar.2011.08.011.
67. Vauzour, D.; Vafeiadou, K.; Rice-Evans, C.; Williams, R.J.; Spencer, J.P. Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. *Journal of neurochemistry* **2007**, *103*, 1355-1367, doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04841.x.
68. Duluc, L.; Jacques, C.; Soleti, R.; Andriantsitohaina, R.; Simard, G. Delphinidin inhibits VEGF induced-mitochondrial biogenesis and Akt activation in endothelial cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2014**, *53*, 9-14, doi:10.1016/j.biocel.2014.03.030.
69. Park, J.J.; Hwang, S.J.; Park, J.H.; Lee, H.J. Chlorogenic acid inhibits hypoxia-induced angiogenesis via down-regulation of the HIF-1alpha/AKT pathway. *Cellular oncology* **2015**, *38*, 111-118, doi:10.1007/s13402-014-0216-2.
70. Lin, C.M.; Chiu, J.H.; Wu, I.H.; Wang, B.W.; Pan, C.M.; Chen, Y.H. Ferulic acid augments angiogenesis via VEGF, PDGF and HIF-1 alpha. *The Journal of nutritional biochemistry* **2010**, *21*, 627-633, doi:10.1016/j.jnutbio.2009.04.001.
71. Prochazkova, D.; Bousova, I.; Wilhelmova, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 513-523, doi:10.1016/j.fitote.2011.01.018.
72. Csepregi, K.; Neugart, S.; Schreiner, M.; Hideg, E. Comparative Evaluation of Total Antioxidant Capacities of Plant Polyphenols. *Molecules* **2016**, *21*, doi:10.3390/molecules21020208.
73. Croft, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1998**, *854*, 435-442, doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09922.x.
74. Dai, J.; Mumper, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **2010**, *15*, 7313-7352, doi:10.3390/molecules15107313.
75. Cavia-Saiz, M.; Busto, M.D.; Pilar-Izquierdo, M.C.; Ortega, N.; Perez-Mateos, M.; Muniz, P. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *Journal of the science of food and agriculture* **2010**, *90*, 1238-1244, doi:10.1002/jsfa.3959.

76. Khoo, H.E.; Azlan, A.; Tang, S.T.; Lim, S.M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & nutrition research* **2017**, *61*, 1361779, doi:10.1080/16546628.2017.1361779.
77. Matera, R.; Gabbanini, S.; Berretti, S.; Amorati, R.; De Nicola, G.R.; Iori, R.; Valgimigli, L. Acylated anthocyanins from sprouts of *Raphanus sativus* cv. Sango: isolation, structure elucidation and antioxidant activity. *Food Chem* **2015**, *166*, 397-406, doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.056.
78. Tamura, H.; Yamagami, A. Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey A grape. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1612–1615, doi:10.1021/jf00044a005.
79. Stintzing, F.C.; Stintzing, A.S.; Carle, R.; Frei, B.; Wrolstad, R.E. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of agricultural and food chemistry* **2002**, *50*, 6172-6181, doi:10.1021/jf0204811.
80. Ali, H.M.; Almagribi, W.; Al-Rashidi, M.N. Antiradical and reductant activities of anthocyanidins and anthocyanins, structure-activity relationship and synthesis. *Food Chem* **2016**, *194*, 1275-1282, doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.003.
81. Rossetto, M.; Vanzani, P.; Lunelli, M.; Scarpa, M.; Mattivi, F.; Rigo, A. Peroxyl radical trapping activity of anthocyanins and generation of free radical intermediates. *Free radical research* **2007**, *41*, 854-859, doi:10.1080/10715760701261533.
82. Rahman, M.M.; Ichianagi, T.; Komiyama, T.; Hatano, Y.; Konishi, T. Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. *Free radical research* **2006**, *40*, 993-1002, doi:10.1080/10715760600815322.
83. Pojer, E.; Mattivi, F.; Johnson, D.; Stockley, C.S. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. *Comprehensive reviews in food science and food safety* **2013**, *12*, 483-508, doi:10.1111/1541-4337.12024.
84. Yeh, C.T.; Ching, L.C.; Yen, G.C. Inducing gene expression of cardiac antioxidant enzymes by dietary phenolic acids in rats. *The Journal of nutritional biochemistry* **2009**, *20*, 163-171, doi:10.1016/j.jnutbio.2008.01.005.
85. Martin, M.A.; Serrano, A.B.; Ramos, S.; Pulido, M.I.; Bravo, L.; Goya, L. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *The Journal of nutritional biochemistry* **2010**, *21*, 196-205, doi:10.1016/j.jnutbio.2008.10.009.
86. Kaviarasan, K.; Kalaiarasi, P.; Pugalendi, V. Antioxidant efficacy of flavonoid-rich fraction from *Spermacoce hispida* in hyperlipidemic rats. *J Appl Biomed* **2008**, *6*, 165-176, doi:Doi 10.32725/Jab.2008.020.
87. Sikkema, J.; de Bont, J.A.; Poolman, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews* **1995**, *59*, 201-222.
88. Borges, A.; Ferreira, C.; Saavedra, M.J.; Simoes, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial drug resistance* **2013**, *19*, 256-265, doi:10.1089/mdr.2012.0244.
89. Lacombe, A.; Wu, V.C.; Tyler, S.; Edwards, K. Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia*

- coli O157:H7. *International journal of food microbiology* **2010**, *139*, 102-107, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.035.
90. Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *TheScientificWorldJournal* **2013**, *2013*, 162750, doi:10.1155/2013/162750.
 91. Xie, Y.; Chen, J.; Xiao, A.; Liu, L. Antibacterial Activity of Polyphenols: Structure-Activity Relationship and Influence of Hyperglycemic Condition. *Molecules* **2017**, *22*, doi:10.3390/molecules22111913.
 92. D'Amelia, V.; Aversano, R.; Chiaiese, P.; Carputo, D. The antioxidant properties of plant flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding. *Phytochem Rev* **2018**, *17*, 611-625, doi:10.1007/s11101-018-9568-y.
 93. Taguri, T.; Tanaka, T.; Kouno, I. Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biological & pharmaceutical bulletin* **2006**, *29*, 2226-2235, doi:10.1248/bpb.29.2226.
 94. Liu, J.; Du, C.; Beaman, H.T.; Monroe, M.B.B. Characterization of Phenolic Acid Antimicrobial and Antioxidant Structure-Property Relationships. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, doi:10.3390/pharmaceutics12050419.
 95. Cueva, C.; Moreno-Arribas, M.V.; Martin-Alvarez, P.J.; Bills, G.; Vicente, M.F.; Basilio, A.; Rivas, C.L.; Requena, T.; Rodriguez, J.M.; Bartolome, B. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in microbiology* **2010**, *161*, 372-382, doi:10.1016/j.resmic.2010.04.006.
 96. Borhidi, A. *A zárwatermők rendszertana molekuláris filogenetikai megközelítésben*; Pécsi Tudományegyetem Biológia Intézete: 2008.
 97. Tutin, T.G.; Burges, N.A.; Chater, A.O.; Edmondson, J.R.; Heywood, V.H.; Moore, D.M.; Valentine, D.H.; Walters, S.M.; Webb, D.A. *Flora Europaea*; Cambridge University Press: Cambridge, 2010.
 98. Grau, J.; Jung, R.; Münker, B. *Bogyósok, vadon termő zöldségnövények, gyógynövények* Magyar Könyvklub: Budapest, 1996.
 99. Nartowska, J.; Wawer, I.; Strzelecka, H. Triterpenoid sapogenin from *Anthyllis vulneraria* L. *Acta poloniae pharmaceutica* **2001**, *58*, 289-291.
 100. Ghalem, M.; Merghache, S.; Ghalem, S.; Belarbi, M. Phenolic contents and in vitro antioxidant activity of some secondary metabolites of *Anthyllis vulneraria* L. from Algeria *Int J Med Pharm Sci* **2012**, *2*, 51-64.
 101. Butura, V. *Ethnobotanical Encyclopaedia of Romania*; Editura „Științifică și Enciclopedică”: Bukarest, 1979.
 102. Borza, A. *Dictionary of Ethnobotany*; Editura Academiei Republicii Socialiste Romania: Bukarest, 1968.
 103. Szabó, L.G. *Gyógynövények*; Schmidt und Co. Kft.. Melius Alapítvány: Baksa-Pécs, 2005.
 104. Makay, B. *Fűvel-fával gyógyítás kézikönyve* Felső-Magyarországi Kiadó: Nyíregyháza, 1994.
 105. Péntek, J.; Szabó, T.A. *Ember és növényvilág. Kalotaszeg növényzete és népi növényismerete* Kriterion: Bukarest, 1985.
 106. Rácz, J. *Növénynevek enciklopédiája*; Tinta Könyvkiadó: Budapest, 2010.

107. Crowden, R.K.; Wright, J.; Harborne, J.B. Anthocyanins of Fuchsia (Onagraceae). *Phytochemistry* **1977**, *16*, 400–402.
108. Jordheim, M.; Skaar, I.; Lunder, H.; Andersen, O.M. Anthocyanins from Fuchsia flowers. *Natural product communications* **2011**, *6*, 35-40.
109. Ruiz, A.; Hermosin-Gutierrez, I.; Vergara, C.; von Baer, D.; Zapata, M.; Hitschfeld, A.; Obando, L.; Mardones, C. Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Food research international* **2013**, *51*, 706-713, doi:10.1016/j.foodres.2013.01.043.
110. Williams, C.A.; Garnockjones, P.J. Leaf Flavonoids and Other Phenolic Glycosides and the Taxonomy and Phylogeny of Fuchsia Sect Skinnera (Onagraceae). *Phytochemistry* **1986**, *25*, 2547-2549, doi:Doi 10.1016/S0031-9422(00)84506-9.
111. Averett, J.E.; Hahn, W.J.; Berry, P.E.; Raven, P.H. Flavonoids and Flavonoid Evolution in Fuchsia (Onagraceae). *Am J Bot* **1986**, *73*, 1525-1534, doi:Doi 10.2307/2443918.
112. Papp, N. „A virágok ... mindegyik orvosság” – *Hagyományok és népi orvoslás Lövétén* Lövetei Közbirtokossága és Polgármestei Hivatal: Lövete, 2018.
113. Koethe, W.H. *1000 Gyógynövény*; Alexandra Kiadó: Budapest, 2008.
114. Podhajská, Z. *Európa vadvirágai*; Madách Könyv- és Lapkiadó: Pozsony, 1991.
115. Horánszky, A.; Járainé, K., M. . *Növényrendszertani praktikum*; Tankönyvkiadó: Budapest, 1991.
116. Münker, B. *Közép-Európa vadvirágai*; Mosaik Verlag GmbH: München, 1992.
117. Toth, A.; Toth, G.; Kery, A. Polyphenol composition and antioxidant capacity of three Lysimachia species. *Natural product communications* **2014**, *9*, 1473-1478.
118. Toth, A.; Vegh, K.; Alberti, A.; Beni, S.; Kery, A. A new ultra-high pressure liquid chromatography method for the determination of antioxidant flavonol aglycones in six Lysimachia species. *Natural product research* **2016**, *30*, 2372-2377, doi:10.1080/14786419.2016.1174233.
119. Podolak, I.; Koczurkiewicz, P.; Michalik, M.; Galanty, A.; Zajdel, P.; Janeczko, Z. A new cytotoxic triterpene saponin from Lysimachia nummularia L. *Carbohydrate research* **2013**, *375*, 16-20, doi:10.1016/j.carres.2013.04.005.
120. Halász, P. *Növények a moldvai magyarok hagyományában és mindennapjaiban* General Press: Budapest, 2010.
121. Papp, N.; Horváth, D. “Ezt nagyon tartották Édesanyámék. Nagyanyámék”. *Homoródkarácsonyfalva hagyományai és népi orvoslása* Homoródkarácsonyfalvi Közbirtokosság, 2016.
122. Csepregi, R.; Temesfoi, V.; Das, S.; Alberti, A.; Toth, C.A.; Herczeg, R.; Papp, N.; Koszegi, T. Cytotoxic, Antimicrobial, Antioxidant Properties and Effects on Cell Migration of Phenolic Compounds of Selected Transylvanian Medicinal Plants. *Antioxidants* **2020**, *9*, doi:10.3390/antiox9020166.
123. Machana, S.; Weerapreeyakul, N.; Barusrux, S.; Nonpunya, A.; Sripanidkulchai, B.; Thitimetharoch, T. Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. *Chin Med-Uk* **2011**, *6*, doi:10.1186/1749-8546-6-39.

124. Aslantürk, Ö.S. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In *Genotoxicity*, Larramendy, M.L., Ed. IntechOpen: 2017; 10.5772/intechopen.71923.
125. Nguyen, S.T.; Hung, L.V.M.; Mai, N.T.T.; Nhan, N.T.; Hai, N.X.; Phan, N.K.; Dinh, K.T.; Pham, P.V. In vitro apoptosis induction ability of methanolic extract of *Paramignya trimera* root (Xao tam phan) in breast cancer stem cells. *Biomed Res Ther* **2019**, *6*, 3325-3332, doi:10.15419/bmrat.v6i8.559.
126. Sali, N.; Nagy, S.; Poor, M.; Koszegi, T. Multiparametric luminescent cell viability assay in toxicology models: A critical evaluation. *J Pharmacol Tox Met* **2016**, *79*, 45-54, doi:10.1016/j.vascn.2016.01.004.
127. Vlaisavljevic, S.; Sibul, F.; Sinka, I.; Zupko, I.; Ocsovszki, I.; Jovanovic-Santa, S. Chemical composition, antioxidant and anticancer activity of licorice from Fruska Gora locality. *Ind Crop Prod* **2018**, *112*, 217-224, doi:10.1016/j.indcrop.2017.11.050.
128. Kwan, Y.P.; Saito, T.; Ibrahim, D.; Al-Hassan, F.M.; Ein Oon, C.; Chen, Y.; Jothy, S.L.; Kanwar, J.R.; Sasidharan, S. Evaluation of the cytotoxicity, cell-cycle arrest, and apoptotic induction by *Euphorbia hirta* in MCF-7 breast cancer cells. *Pharmaceutical biology* **2016**, *54*, 1223-1236, doi:10.3109/13880209.2015.1064451.
129. Krysko, O.; de Ridder, L.; Cornelissen, M. Phosphatidylserine exposure during early primary necrosis (oncosis) in JB6 cells as evidenced by immunogold labeling technique. *Apoptosis* **2004**, *9*, 495-500, doi:10.1023/B:Appt.0000031452.75162.75.
130. Bonneau, M.J.; Poulin, R. Spermine oxidation leads to necrosis with plasma membrane phosphatidylserine redistribution in mouse leukemia cells. *Experimental cell research* **2000**, *259*, 23-34, doi:10.1006/excr.2000.4974.
131. Mery, B.; Guy, J.B.; Vallard, A.; Espenel, S.; Ardail, D.; Rodriguez-Lafrasse, C.; Rancoule, C.; Magne, N. In Vitro Cell Death Determination for Drug Discovery: A Landscape Review of Real Issues. *Journal of cell death* **2017**, *10*, 1179670717691251, doi:10.1177/1179670717691251.
132. Astashkina, A.; Mann, B.; Grainger, D.W. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacology & therapeutics* **2012**, *134*, 82-106, doi:10.1016/j.pharmthera.2012.01.001.
133. Bradbury, D.A.; Simmons, T.D.; Slater, K.J.; Crouch, S.P.M. Measurement of the ADP : ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis. *J Immunol Methods* **2000**, *240*, 79-92, doi:10.1016/S0022-1759(00)00178-2.
134. Klingenberg, M. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochimica et biophysica acta* **2008**, *1778*, 1978-2021, doi:10.1016/j.bbamem.2008.04.011.
135. Koszegi, T.; Petrik, J.; Vladimir-Knezevic, S.; Nagy, S. Co-determination of ATP and proteins in Triton X 100 non-ionic detergent-opened monolayer cultured cells. *Luminescence* **2007**, *22*, 415-419, doi:10.1002/bio.979.
136. Coban, A.Y.; Deveci, A.; Sunter, A.T.; Palomino, J.C.; Martin, A. Resazurin microtiter assay for isoniazid, rifampicin, ethambutol and streptomycin resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: Updated meta-analysis. *International journal of mycobacteriology* **2014**, *3*, 230-241, doi:10.1016/j.ijmyco.2014.09.002.

137. Prabst, K.; Engelhardt, H.; Ringgeler, S.; Hubner, H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods in molecular biology* **2017**, *1601*, 1-17, doi:10.1007/978-1-4939-6960-9_1.
138. Rodriguez-Corrales, J.A.; Josan, J.S. Resazurin Live Cell Assay: Setup and Fine-Tuning for Reliable Cytotoxicity Results. *Methods in molecular biology* **2017**, *1647*, 207-219, doi:10.1007/978-1-4939-7201-2_14.
139. Bueno, C.; Villegas, M.L.; Bertolotti, S.G.; Previtali, C.M.; Neumann, M.G.; Encinas, M.V. The excited-state interaction of resazurin and resorufin with amines in aqueous solutions. Photophysics and photochemical reaction. *Photochem Photobiol* **2002**, *76*, 385-390.
140. Neufeld, B.H.; Tapia, J.B.; Lutzke, A.; Reynolds, M.M. Small Molecule Interferences in Resazurin and MTT-Based Metabolic Assays in the Absence of Cells. *Analytical chemistry* **2018**, *90*, 6867-6876, doi:10.1021/acs.analchem.8b01043.
141. Pace, R.T.; Burg, K.J. Toxic effects of resazurin on cell cultures. *Cytotechnology* **2015**, *67*, 13-17, doi:10.1007/s10616-013-9664-1.
142. Riss, T.L.; Moravec, R.A.; Niles, A.L.; Duellman, S.; Benink, H.A.; Worzella, T.J.; Minor, L. Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual*, Markossian, S., Sittampalam, G.S., Grossman, A., Brimacombe, K., Arkin, M., Auld, D., Austin, C.P., Baell, J., Caaveiro, J.M.M., Chung, T.D.Y., et al., Eds. Bethesda (MD), 2004.
143. Csepregi, R.; Lemli, B.; Kunsagi-Mate, S.; Szente, L.; Koszegi, T.; Nemeti, B.; Poor, M. Complex Formation of Resorufin and Resazurin with Beta-Cyclodextrins: Can Cyclodextrins Interfere with a Resazurin Cell Viability Assay? *Molecules* **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23020382.
144. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **1976**, *72*, 248-254, doi:10.1006/abio.1976.9999.
145. Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical biochemistry* **1985**, *150*, 76-85, doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
146. Castell, J.V.; Cervera, M.; Marco, R. A convenient micromethod for the assay of primary amines and proteins with fluorescamine. A reexamination of the conditions of reaction. *Analytical biochemistry* **1979**, *99*, 379-391, doi:10.1016/s0003-2697(79)80022-6.
147. Stockert, J.C.; Blazquez, A.; Galaz, S.; Juarranz, A. A mechanism for the fluorogenic reaction of amino groups with fluorescamine and MDPF. *Acta histochemica* **2008**, *110*, 333-340, doi:10.1016/j.acthis.2007.10.011.
148. Chutipongtanate, S.; Watcharatanyatip, K.; Homvises, T.; Jaturongkakul, K.; Thongboonkerd, V. Systematic comparisons of various spectrophotometric and colorimetric methods to measure concentrations of protein, peptide and amino acid: Detectable limits, linear dynamic ranges, interferences, practicality and unit costs. *Talanta* **2012**, *98*, 123-129, doi:10.1016/j.talanta.2012.06.058.
149. Krohn, R.I. The colorimetric detection and quantitation of total protein. *Current protocols in cell biology* **2002**, *Appendix 3*, Appendix 3H, doi:10.1002/0471143030.cba03hs15.

150. Csepregi, R.; Temesfoi, V.; Poor, M.; Faust, Z.; Koszegi, T. Green Fluorescent Protein-Based Viability Assay in a Multiparametric Configuration. *Molecules* **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23071575.
151. Ghiselli, A.; Serafini, M.; Natella, F.; Scaccini, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radical Bio Med* **2000**, *29*, 1106-1114, doi:Doi 10.1016/S0891-5849(00)00394-4.
152. Rubio, C.P.; Hernandez-Ruiz, J.; Martinez-Subiela, S.; Tvarijonaviciute, A.; Ceron, J.J. Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. *BMC veterinary research* **2016**, *12*, 166, doi:10.1186/s12917-016-0792-7.
153. Mader, E.A.; Davidson, E.R.; Mayer, J.M. Large ground-state entropy changes for hydrogen atom transfer reactions of iron complexes. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 5153-5166, doi:10.1021/ja0686918.
154. Apak, R.; Ozyurek, M.; Guclu, K.; Capanoglu, E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *Journal of agricultural and food chemistry* **2016**, *64*, 997-1027, doi:10.1021/acs.jafc.5b04739.
155. Ashby, E.C. Single-Electron Transfer, a Major Reaction Pathway in Organic-Chemistry - an Answer to Recent Criticisms. *Accounts Chem Res* **1988**, *21*, 414-421, doi:Doi 10.1021/Ar00155a005.
156. Liang, N.J.; Kitts, D.D. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules* **2014**, *19*, 19180-19208, doi:10.3390/molecules191119180.
157. Cao, G.H.; Alessio, H.M.; Cutler, R.G. Oxygen-radical absorbancy capacity assay for antioxidants. *Free Radical Bio Med* **1993**, *14*, 303-311, doi:10.1016/0891-5849(93)90027-r.
158. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry* **2005**, *53*, 1841-1856, doi:10.1021/jf030723c.
159. Prior, R.L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *Journal of agricultural and food chemistry* **2003**, *51*, 3273-3279, doi:10.1021/jf0262256.
160. Alho, H.; Leinonen, J. Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods. *Methods in enzymology* **1999**, *299*, 3-15, doi:10.1016/s0076-6879(99)99004-3.
161. Robinson, E.E.; Maxwell, S.R.J.; Thorpe, G.H.G. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free radical research* **1997**, *26*, 291-302, doi:Doi 10.3109/10715769709097807.
162. Muller, C.H.; Lee, T.K.; Montano, M.A. Improved chemiluminescence assay for measuring antioxidant capacity of seminal plasma. *Methods in molecular biology* **2013**, *927*, 363-376, doi:10.1007/978-1-62703-038-0_31.
163. Koszegi, T.; Sali, N.; Raknic, M.; Horvath-Szalai, Z.; Csepregi, R.; Koncic, M.Z.; Papp, N.; Poor, M. A novel luminol-based enhanced chemiluminescence antioxidant

- capacity microplate assay for use in different biological matrices. *J Pharmacol Tox Met* **2017**, 88, 153-159, doi:10.1016/j.vascn.2017.09.256.
164. Frankel, E.N.; Meyer, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the science of food and agriculture* **2000**, 80, 1925-1941, doi:10.1002/1097-0010(200010)80:13<1925::Aid-Jsfa714>3.0.Co;2-4.
 165. Alam, M.N.; Bristi, N.J.; Rafiquzzaman, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* **2013**, 21, 143-152, doi:10.1016/j.jsps.2012.05.002.
 166. Balogh, E.; Hegedus, A.; Stefanovits-Banyai, E. Application of and correlation among antioxidant and antiradical assays for characterizing antioxidant capacity of berries. *Sci Hortic-Amsterdam* **2010**, 125, 332-336, doi:10.1016/j.scienta.2010.04.015.
 167. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology & medicine* **1999**, 26, 1231-1237, doi:10.1016/s0891-5849(98)00315-3.
 168. Stratil, P.; Klejdus, B.; Kuban, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta* **2007**, 71, 1741-1751, doi:10.1016/j.talanta.2006.08.012.
 169. Floegel, A.; Kim, D.O.; Chung, S.J.; Koo, S.I.; Chun, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compos Anal* **2011**, 24, 1043-1048, doi:10.1016/j.jfca.2011.01.008.
 170. Zulueta, A.; Esteve, M.J.; Frigola, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* **2009**, 114, 310-316, doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.033.
 171. Xu, D.P.; Li, Y.; Meng, X.; Zhou, T.; Zhou, Y.; Zheng, J.; Zhang, J.J.; Li, H.B. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *International journal of molecular sciences* **2017**, 18, doi:10.3390/ijms18010096.
 172. Wolfe, K.L.; Liu, R.H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry* **2007**, 55, 8896-8907, doi:10.1021/jf0715166.
 173. Pavelescu, L.A. On reactive oxygen species measurement in living systems. *Journal of medicine and life* **2015**, 8 Spec Issue, 38-42.
 174. Djiadeu, P.; Azzouz, D.; Khan, M.A.; Kotra, L.P.; Swezey, N.; Palaniyar, N. Ultraviolet irradiation increases green fluorescence of dihydrorhodamine (DHR) 123: false-positive results for reactive oxygen species generation. *Pharmacology research & perspectives* **2017**, 5, e00303, doi:10.1002/prp2.303.
 175. Kalyanaraman, B.; Darley-USmar, V.; Davies, K.J.; Dennery, P.A.; Forman, H.J.; Grisham, M.B.; Mann, G.E.; Moore, K.; Roberts, L.J., 2nd; Ischiropoulos, H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free radical biology & medicine* **2012**, 52, 1-6, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030.

176. Balaiya, S.; Chalam, K.V. An In vitro Assay to Quantify Nitrosative Component of Oxidative Stress. *Journal of molecular and genetic medicine : an international journal of biomedical research* **2014**, *8*, doi:10.4172/1747-0862.1000120.
177. Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R.E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols* **2008**, *3*, 163-175, doi:10.1038/nprot.2007.521.
178. Das, S.; Gazdag, Z.; Szente, L.; Meggyes, M.; Horvath, G.; Lemli, B.; Kunsagi-Mate, S.; Kuzma, M.; Koszegi, T. Antioxidant and antimicrobial properties of randomly methylated beta cyclodextrin - captured essential oils. *Food Chemistry* **2019**, *278*, 305-313, doi:10.1016/j.foodchem.2018.11.047.
179. Holla, G.; Yeluri, R.; Munshi, A.K. Evaluation of minimum inhibitory and minimum bactericidal concentration of nano-silver base inorganic anti-microbial agent (Novaron((R))) against streptococcus mutans. *Contemporary clinical dentistry* **2012**, *3*, 288-293, doi:10.4103/0976-237X.103620.
180. Fenyvesi, E.; Vikmon, M.; Szente, L. Cyclodextrins in Food Technology and Human Nutrition: Benefits and Limitations. *Critical reviews in food science and nutrition* **2016**, *56*, 1981-2004, doi:10.1080/10408398.2013.809513.
181. Bochot, A.; Piel, G. Applications of cyclodextrins for skin formulation and delivery. In *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics and Biomedicine, Current and Future Industrial Applications*, Bilensoy, E., Ed. John Willey & Sons: Hoboken: NJ, USA, 2011; pp. 159–176.
182. Duchene, D.; Bochot, A. Thirty years with cyclodextrins. *International journal of pharmaceutics* **2016**, *514*, 58-72, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.07.030.
183. Poor, M.; Kunsagi-Mate, S.; Sali, N.; Koszegi, T.; Szente, L.; Peles-Lemli, B. Interactions of zearalenone with native and chemically modified cyclodextrins and their potential utilization. *J Photoch Photobio B* **2015**, *151*, 63-68, doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.07.009.
184. Poor, M.; Matisz, G.; Kunsagi-Mate, S.; Derdak, D.; Szente, L.; Lemli, B. Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction of citrinin with native and chemically modified cyclodextrins. *J Lumin* **2016**, *172*, 23-28, doi:10.1016/j.jlumin.2015.11.011.
185. Szente, L.; Szejtli, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Advanced drug delivery reviews* **1999**, *36*, 17-28, doi:10.1016/s0169-409x(98)00092-1.
186. Kumar, B.; Vijayakumar, M.; Govindarajan, R.; Pushpangadan, P. Ethnopharmacological approaches to wound healing--exploring medicinal plants of India. *Journal of ethnopharmacology* **2007**, *114*, 103-113, doi:10.1016/j.jep.2007.08.010.
187. Lee, J.H.; Cho, S.; Paik, H.D.; Choi, C.W.; Nam, K.T.; Hwang, S.G.; Kim, S.K. Investigation on Antibacterial and Antioxidant Activities, Phenolic and Flavonoid Contents of Some Thai Edible Plants as an Alternative for Antibiotics. *Asian Austral J Anim* **2014**, *27*, 1461-1468, doi:10.5713/ajas.2013.13629.
188. Beretta, G.; Granata, P.; Ferrero, M.; Orioli, M.; Facino, R.M. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric

- assays and chemometrics. *Anal Chim Acta* **2005**, 533, 185-191, doi:10.1016/j.aca.2004.11.010.
189. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, 680-685, doi:10.1038/227680a0.
 190. Bodzon-Kulakowska, A.; Bierczynska-Krzysik, A.; Dylag, T.; Drabik, A.; Suder, P.; Noga, M.; Jarzebinska, J.; Silberring, J. Methods for samples preparation in proteomic research. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2007**, 849, 1-31, doi:10.1016/j.jchromb.2006.10.040.
 191. Barbier, O.; Arreola-Mendoza, L.; Del Razo, L.M. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chemico-biological interactions* **2010**, 188, 319-333, doi:10.1016/j.cbi.2010.07.011.
 192. Warburg, O.; Geissler, A.W.; Lorenz, S. Measurement of oxygen pressure during the conversion of embryonic metabolism into Krebs cycle metabolism. *Z. Naturforsch. B* **1965**, 20, 1070-1073.
 193. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, 144, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
 194. Tao, Y.; Xie, S.; Xu, F.; Liu, A.; Wang, Y.; Chen, D.; Pan, Y.; Huang, L.; Peng, D.; Wang, X., et al. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **2018**, 112, 320-331, doi:10.1016/j.fct.2018.01.002.
 195. Ringot, D.; Chango, A.; Schneider, Y.J.; Larondelle, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-biological interactions* **2006**, 159, 18-46, doi:10.1016/j.cbi.2005.10.106.
 196. Schneider-Poetsch, T.; Ju, J.; Eyler, D.E.; Dang, Y.; Bhat, S.; Merrick, W.C.; Green, R.; Shen, B.; Liu, J.O. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature chemical biology* **2010**, 6, 209-217, doi:10.1038/nchembio.304.
 197. Leist, M.; Single, B.; Castoldi, A.F.; Kuhnle, S.; Nicotera, P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: A switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* **1997**, 185, 1481-1486, doi:DOI 10.1084/jem.185.8.1481.
 198. Zamaraeva, M.V.; Sabirov, R.Z.; Maeno, E.; Ando-Akatsuka, Y.; Bessonova, S.V.; Okada, Y. Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell death and differentiation* **2005**, 12, 1390-1397, doi:10.1038/sj.cdd.4401661.
 199. Fenyvesi, F.; Reti-Nagy, K.; Bacso, Z.; Gutay-Toth, Z.; Malanga, M.; Fenyvesi, E.; Szente, L.; Varadi, J.; Ujhelyi, Z.; Feher, P., et al. Fluorescently labeled methyl-beta-cyclodextrin enters intestinal epithelial Caco-2 cells by fluid-phase endocytosis. *PLoS one* **2014**, 9, e84856, doi:10.1371/journal.pone.0084856.
 200. Jambhekar, S.S.; Breen, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: solubilization, binding constant, and complexation efficiency. *Drug Discov Today* **2016**, 21, 363-368, doi:10.1016/j.drudis.2015.11.016.
 201. Godevac, D.; Zdunic, G.; Savikin, K.; Vajs, V.; Menkovic, N. Antioxidant activity of nine Fabaceae species growing in Serbia and Montenegro. *Fitoterapia* **2008**, 79, 185-187, doi:10.1016/j.fitote.2007.10.001.

202. Suganda, A.G.; Amoros, M.; Girre, L.; Fauconnier, B. Inhibitory effects of some crude and semi-purified extracts of indigenous French plants on the multiplication of human herpesvirus 1 and poliovirus 2 in cell culture. *J Nat Prod* **1983**, *46*, 626-632, doi:10.1021/np50029a006.
203. Kondorosy, F. *Gyógynövények Homoródszentmártonban – etnofarmakobotanikai értékelés* Szakdolgozat: Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar Farmakognóziái Intézet, Pécs, 2016.
204. Boros, K. *Etnofarmakobotanikai felmérés Recsenyédén – A Lysimachia nummularia L. fitokémiai vizsgálata Recsenyéről és a szomszédos falvakból*; Szakdolgozat, Facultatea de Farmacie Disciplina de Farmacognozie și Fitoterapie: Universitatea de Medicină și Farmacie Târgu Mureș, 2017.
205. Dénes, T.; Tóth, M.; Gyergyák, K.; Lőrincz, P.; Varga, E.; Papp, N. Szemelvények Homoródmás (Erdély) népi gyógynövényismeretéből. *Botanikai Közlemények* **2014**, *101*, 227-241.
206. Bartha, S.G. *Népi gyógynövényismeret Erdővidéken*; Szakdolgozat. : Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Farmakognóziái Tanszék, Pécs, 2013.
207. Gonnett, J.F.; Jay, M. Les aglycones flavoniques d'Anthyllis vulneraria. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 2313-2316.
208. Lorenz, P.; Bunse, M.; Klaiber, I.; Conrad, J.; Laumann-Lipp, T.; Stintzing, F.C.; Kammerer, D.R. Comprehensive Phytochemical Characterization of Herbal Parts from Kidney Vetch (*Anthyllis vulneraria* L.) by LC/MS(n) and GC/MS. *Chemistry & biodiversity* **2020**, *17*, e2000485, doi:10.1002/cbdv.202000485.
209. Werner, S.; Krieg, T.; Smola, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *The Journal of investigative dermatology* **2007**, *127*, 998-1008, doi:10.1038/sj.jid.5700786.
210. Cote, J.; Caillet, S.; Doyon, G.; Dussault, D.; Sylvain, J.F.; Lacroix, M. Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts. *Food Control* **2011**, *22*, 1413-1418, doi:10.1016/j.foodcont.2011.02.024.
211. Puupponen-Pimia, R.; Nohynek, L.; Meier, C.; Kahkonen, M.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Oksman-Caldentey, K.M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of applied microbiology* **2001**, *90*, 494-507, doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01271.x.
212. Burdulis, D.; Sarkinas, A.; Jasutiene, I.; Stackevicene, E.; Nikolajevs, L.; Janulis, V. Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. *Acta poloniae pharmaceutica* **2009**, *66*, 399-408.
213. Ouerfelli, M.; Bettaieb Ben Kaab, L.; Almajano, M.P. Radical Scavenging and Antioxidant Activity of *Anthyllis Vulneraria* Leaves and Flowers. *Molecules* **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23071657.
214. Fukumoto, L.R.; Mazza, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry* **2000**, *48*, 3597-3604, doi:10.1021/jf000220w.

215. Milicevic, A. The relationship between antioxidant activity, first electrochemical oxidation potential, and spin population of flavonoid radicals. *Arh Hig Rada Toksiko* **2019**, *70*, 134-139, doi:10.2478/aiht-2019-70-3290.
216. Borkowski, T.; Szymusiak, H.; Gliszczynska-Swiglo, A.; Rietjens, I.M.C.M.; Tyrakowska, B. Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent. *Journal of agricultural and food chemistry* **2005**, *53*, 5526-5534, doi:10.1021/jf0478556.
217. Vang Mouritzen, M.; Jenssen, H. Optimized Scratch Assay for In Vitro Testing of Cell Migration with an Automated Optical Camera. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2018**, 10.3791/57691, doi:10.3791/57691.
218. Scheitza, S.; Bonifas, J.; Blomeke, B. Variable NAT1 enzyme activity in long-term cultured human HaCaT keratinocytes. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* **2012**, *75*, 471-477, doi:10.1080/15287394.2012.674915.
219. Brooks, R.F.; Riddle, P.N. The 3t3 Cell-Cycle at Low Proliferation Rates. *J Cell Sci* **1988**, *90*, 601-612.
220. Nizamutdinova, I.T.; Kim, Y.M.; Chung, J.I.; Shin, S.C.; Jeong, Y.K.; Seo, H.G.; Lee, J.H.; Chang, K.C.; Kim, H.J. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **2009**, *47*, 2806-2812, doi:10.1016/j.fct.2009.08.016.
221. Gyires, K.; Fürst, Z. *A farmakológia alapjai*; Medicina Könyvkiadó Zrt: Budapest, 2011.
222. Boivin, D.; Blanchette, M.; Barrette, S.; Moghrabi, A.; Beliveau, R. Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFkappaB by edible berry juice. *Anticancer research* **2007**, *27*, 937-948.
223. Lee, S.G.; Brownmiller, C.R.; Lee, S.O.; Kang, H.W. Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Anthocyanins of *Trifolium pratense* (Red Clover) in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW-267.4 Macrophages. *Nutrients* **2020**, *12*, doi:10.3390/nu12041089.
224. Afaq, F.; Saleem, M.; Krueger, C.G.; Reed, J.D.; Mukhtar, H. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *International journal of cancer* **2005**, *113*, 423-433, doi:10.1002/ijc.20587.
225. Seeram, N.P.; Momin, R.A.; Nair, M.G.; Bourquin, L.D. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **2001**, *8*, 362-369, doi:10.1078/0944-7113-00053.
226. Hou, D.X.; Yanagita, T.; Uto, T.; Masuzaki, S.; Fujii, M. Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. *Biochemical pharmacology* **2005**, *70*, 417-425, doi:10.1016/j.bcp.2005.05.003.
227. Karlsson, S.; Nanberg, E.; Fjaeraa, C.; Wijkander, J. Ellagic acid inhibits lipopolysaccharide-induced expression of enzymes involved in the synthesis of

- prostaglandin E2 in human monocytes. *The British journal of nutrition* **2010**, *103*, 1102-1109, doi:10.1017/S0007114509992935.
228. Cho, Y.H.; Kim, N.H.; Khan, I.; Yu, J.M.; Jung, H.G.; Kim, H.H.; Jang, J.Y.; Kim, H.J.; Kim, D.I.; Kwak, J.H., et al. Anti-inflammatory Potential of Quercetin-3-O-beta-D-("2"-galloyl)-glucopyranoside and Quercetin Isolated from Diospyros kaki calyx via Suppression of MAP Signaling Molecules in LPS-induced RAW 264.7 Macrophages. *Journal of food science* **2016**, *81*, C2447-C2456, doi:10.1111/1750-3841.13497.
229. Xiao, J.B. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Critical reviews in food science and nutrition* **2017**, *57*, 1874-1905, doi:10.1080/10408398.2015.1032400.
230. Liu, J.; Tian, S.; Fu, M.; He, Y.; Yu, H.; Cao, X.; Cao, Y.; Xu, H. Protective Effects of Anthocyanins from *Coreopsis tinctoria* against Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide in MIN6 Cells. *Chemistry & biodiversity* **2020**, *17*, e1900587, doi:10.1002/cbdv.201900587.
231. Lamy, S.; Akla, N.; Ouanouki, A.; Lord-Dufour, S.; Beliveau, R. Diet-derived polyphenols inhibit angiogenesis by modulating the interleukin-6/STAT3 pathway. *Experimental cell research* **2012**, *318*, 1586-1596, doi:10.1016/j.yexcr.2012.04.004.
232. Clifford, M.N.; Johnston, K.L.; Knight, S.; Kuhnert, N. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2900-2911, doi:10.1021/jf026187q.
233. Said, R.B.; Hamed, A.I.; Mahalel, U.A.; Al-Ayed, A.S.; Kowalczyk, M.; Moldoch, J.; Oleszek, W.; Stochmal, A. Tentative Characterization of Polyphenolic Compounds in the Male Flowers of *Phoenix dactylifera* by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry and DFT. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 512.
234. Alberti, A.; Beni, S.; Lacko, E.; Riba, P.; Al-Khrasani, M.; Kery, A. Characterization of phenolic compounds and antinociceptive activity of *Sempervivum tectorum* L. leaf juice. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *70*, 143-150, doi:10.1016/j.jpba.2012.06.017.
235. Lorenz, P.; Conrad, J.; Bertrams, J.; Berger, M.; Duckstein, S.; Meyer, U.; Stintzing, F.C. Investigations into the Phenolic Constituents of Dog's Mercury (*Mercurialis perennis* L.) by LC-MS/MS and GC-MS analyses. *Phytochem. Anal.* **2012**, *23*, 60-71.
236. Abad-García, B.; Berrueta, L.A.; Garmón-Lobato, S.; Gallo, B.; Vicente, F. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode-array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2009**, *1216*, 5398-5415.
237. Rösch, D.; Krumbein, A.; Mügge, C.; Kroh, L.W. Structural Investigations of Flavonol Glycosides from Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Pomace by NMR Spectroscopy and HPLC-ESI-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4039-4046.
238. Simirgiotis, M.J.; Schmeda-Hirschmann, G. Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2010**, *1217*, 443-449.
239. Kang, J.; Price, W.E.; Ashton, J.; Tapsell, L.C.; Johnson, S. Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MS. *Food Chem.* **2016**, *211*, 215-226, doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.052.

240. Chen, Y.; Yu, H.; Wu, H.; Pan, Y.; Wang, K.; Jin, Y.; Zhang, C. Characterization and Quantification by LC-MS/MS of the Chemical Components of the Heating Products of the Flavonoids Extract in Pollen Typhae for Transformation Rule Exploration. *Molecules* **2015**, *20*, 18352-18366, doi:10.3390/molecules201018352.
241. Tóth, A.; Riethmüller, E.; Alberti, Á.; Végh, K.; Kéry, Á. Comparative Phytochemical Screening of Phenoloids in Lysimachia Species. *Eur. Chem. Bull.* **2012**, *1*, 27–30.
242. Lin, L.Z.; Harnly, J.M. Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) *Food Chem.* **2010**, *120*, 319–326.
243. de Brito, E.S.; de Araujo, M.C.; Lin, L.Z.; Harnly, J. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. *Food Chem.* **2007**, *105*, 1112-1118, doi:10.1016/j.foodchem.2007.02.009.
244. Kumar, S.; Singh, A.; Kumar, B. Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of *Phyllanthus* species by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *J. Pharm. Anal.* **2017**, *7*, 214-222, doi:10.1016/j.jpha.2017.01.005.
245. Mena, P.; Cirilini, M.; Tassotti, M.; Herrlinger, K.A.; Dall'Asta, C.; Del Rio, D. Phytochemical Profiling of Flavonoids, Phenolic Acids, Terpenoids, and Volatile Fraction of a Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract. *Molecules* **2016**, *21*, doi:10.3390/molecules21111576.
246. Bouaoudia-Madi, N.; Boulekbache-Makhlouf, L.; Madani, K.; Silva, A.M.S.; Dairi, S.; Oukhmanou-Bensidhoum, S.; Cardoso, S.M. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenols from *Myrtus communis* L. Pericarp. *Antioxidants* **2019**, *8*, doi:10.3390/antiox8070205.
247. Li, Y.; Wang, C.; Li, H.; Yu, T.; Tan, L. Simultaneous Determination of Formononetin, Calycosin and Rhamnocitrin from *Astragalus Complanatus* by UHPLC-MS-MS in Rat Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study. *J. Chromatogr. Sci.* **2016**, *54*, 1605-1612, doi:10.1093/chromsci/bmw110.
248. Wu, X.; Prior, R.L. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. *J. Agric. Food. Chem.* **2005**, *53*, 3101-3113, doi:10.1021/jf0478861.
249. Mazzuca, P.; Ferranti, P.; Picariello, G.; Chianese, L.; Addeo, F. Mass spectrometry in the study of anthocyanins and their derivatives: differentiation of *Vitis vinifera* and hybrid grapes by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry : JMS* **2005**, *40*, 83-90, doi:10.1002/jms.778.

Internetes hivatkozások:

1. WHO. 2002. WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005. <http://www.who.int/medicines/publications/traditionalpolicy/en/index.html>, accessed 7 March 2016.
2. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids>)
3. ISE 2007. International Society of Ethnobiology. The Code of Ethics of the International Society of Ethnobiology. 2007. Available at: http://www.ethnobiology.net/global_coalition/ethics.php (Verified 31 January 2010)

IX. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK, ELŐADÁSOK LISTÁJA

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Csepregi R, Temesfői V, Das S, Alberti Á, Tóth CA, Herczeg R, Papp N, Kőszegi T: Cytotoxic, Antimicrobial, Antioxidant Properties and Effects on Cell Migration of Phenolic Compounds of Selected Transylvanian Medicinal Plants. *Antioxidants*. 9 : 2 Paper: 166, 29 p. (2020) **IF: 6,312; Q2**

Csepregi R, Temesfői V, Poór M, Faust Zs, Kőszegi T: Green Fluorescent Protein-Based Viability Assay in a Multiparametric Configuration. *Molecules*. 23 : 7 Paper: 1575, 12 p. (2018) **IF: 3,060; Q1**

Csepregi R, Lemli B, Kunsági-Máté S, Sente L, Kőszegi T, Németi B, Poór M: Complex Formation of Resorufin and Resazurin with B-Cyclodextrins: Can Cyclodextrins Interfere with a Resazurin Cell Viability Assay? *Molecules*. 23 : 2 Paper: 382, 16 p. (2018) **IF: 3,060; Q1**

Az értekezés alapját képező közlemények összesített impakt faktora: 12,432

Az értekezés alapjául szolgáló konferencia előadások, poszterek

Csepregi R, Kerényi M, Kőszegi T, Fodor-Grisnik I, Das S, Papp, N: Antioxidant and antimicrobial investigation of *Lysimachia nummularia* L. applied in the Transylvanian Ethnomedicine. Online Konferencia. Debrecen. Acta Pharmaceutica Hungarica 90: 2-3 pp. 112-112., 1 p. (2020)

Csepregi R, Kőszegi T: Erdélyi gyógynövények biológiai hatásának vizsgálata. In: Erdélyi népi gyógyászat – hagyományoktól az alkalmazásig konferencia, Magyarország- Pécs. (2019) p. ismeretlen

Csepregi R, Papp N, Kőszegi T: In vitro antioxidant activity of some Romanian medicinal plants. In: The 21st International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants. Franciaország-Párizs. (2019) pp. 89-89., 1 p.

Csepregi R, Papp N, Kőszegi T: Cytotoxicity, antioxidant activity and effects on cell migration of selected medicinal plants: evaluation in human keratinocytes. In: 13th World Congress on Polyphenols Applications. Málta-Valletta. (2019) pp. 78-78., 1 p.

Papp N, Tóth Cs, Tóth A, **Csepregi R**, Alberti Á: Polyphenols in plants used in the transylvanian ethnomedicine. In: 13th World Congress on Polyphenols Applications. Málta-Valletta. (2019) pp. 112-112., 1 p.

Csepregi R, Temesfői V, Kőszegi T: Multiparametric Green Fluorescent Protein-Based Microplate Cell Viability Assay. In: Analytical and Nanoanalytical eMethods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-ANMBES). Románia- Brassó. 2018. pp 119-119., 1p.

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó egyéb közlemények

Balázs A, Faisal Z, **Csepregi R**, Kőszegi T, Kriszt B Szabó I, Poór M: In Vitro Evaluation of the Individual and Combined Cytotoxic and Estrogenic Effects of Zearalenone, Its Reduced Metabolites, Alternariol, and Genistein. *Int. J. Mol. Sci.* 22 : 12 Paper: 6281 , 15 p. (2021) **IF: 5,923; Q1**

Bodó A, Radványi L, Kőszegi T, **Csepregi R**, Nagy DU, Farkas Á, Kocsis M: Quality Evaluation of Light- and Dark-Colored Hungarian Honeys, Focusing on Botanical Origin, Antioxidant Capacity and Mineral Content. *Molecules* 26: 9 Paper: 2825, 15 p. (2021) **IF: 4,411; Q1**

Bodó A, Radványi L, Kőszegi T, **Csepregi R**, Nagy DU, Farkas Á, Kocsis M: Melissopalynology, antioxidant activity and multielement analysis of two types of early spring honeys from Hungary. *Food Bioscience.* 35 Paper: 100587, 8 p. (2020) **IF: 4,240; Q1**

Faisal Z, Vörös V, Fliszár-Nyúl E, Lemli B, Kunsági-Máté S, **Csepregi R**, Kőszegi T, Zsila Ferenc, Poór M: Probing the Interactions of Ochratoxin B, Ochratoxin C, Patulin, Deoxynivalenol, and T-2 Toxin with Human Serum Albumin. *Toxins* 12: 6 Paper: 392, 17 p. (2020) **IF: 4,546; Q1**

Faisal Z, Garai E, **Csepregi R**, Bakos K, Fliszár-Nyúl E, Sente L, Balázs A, Cserhádi M, Kőszegi T, Urbányi B, Csenki Z, Poór M: Protective effects of beta-cyclodextrins vs. zearalenone-induced toxicity in HeLa cells and Tg(vtg1:mCherry) zebrafish embryos *Chemosphere.* 240 Paper: 124948, 11 p. (2020) **IF: 7,086; Q1**

Fliszár-Nyúl E, Mohos V, **Csepregi R**, Mladěnka P, Poór M: Inhibitory effects of polyphenols and their colonic metabolites on CYP2D6 enzyme using two different substrates. *Biomed Pharmacother.* 131 Paper: 110732, 11 p. (2020) **IF: 6,529; Q1**

Faisal Z, Vörös V, Lemli B, Derdák D, Kunsági-Máté S, Bálint M, Hetényi C, **Csepregi R**, Kőszegi T, Bergmann D, Sueck F, Humpf HU, Cramer B, Poór M: Interaction of the mycotoxin metabolite dihydrocitrinone with serum albumin. *Mycotoxin Res.* 35: 2 pp. 129-139., 11 p. (2019) **IF: 3,164; Q2**

Papp N, Sali N, **Csepregi R**, Tóth M, Gyergyák K, Dénes T, Bartha SG, Varga E, Kaszás A, Kőszegi T: Antioxidant potential of some plants used in folk medicine in Romania. *Farmacia (Bucharest)* 67: 2 pp. 323-330., 8 p. (2019) **IF: 1,607; Q2**

Csepregi R, Temesfői V, Sali N, Poór M, Needs WP, Kroon AP, Kőszegi T: A one-step extraction and luminescence assay for quantifying glucose and ATP levels in cultured HepG2 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19 : 9 Paper: 2670, 18 p. (2018) **IF: 4,183; Q1**

Faisal Z, Derdák D, Lemli B, Kunsági-Máté S, Bálint M, Hetényi C, **Csepregi R**, Kőszegi T, Sueck F, Cramer B, Humpf HU, Poór M: Interaction of 2'R-ochratoxin A with Serum Albumins: Binding Site, Effects of Site Markers, Thermodynamics, Species Differences of Albumin-binding, and Influence of Albumin on Its Toxicity in MDCK Cells. *Toxins.* 10: 9 Paper: 353, 16 p. (2018) **IF: 3,895; Q1**

Saghy E, Payrits M, Biro-Suto T, Skoda-Foldes R, Szanti-Pinter E, Erostyak J, Makkai G, Setalo G Jr, Kollar L, Koszegi T, **Csepregi R**, Szolcsanyi J, Helyes Z, Szoke E: Carboxamido steroids inhibit the opening properties of Transient Receptor Potential ion channels by lipid raft modulation. *J. Lipid Res.* 59: 10 pp. 1851-1863., 13 p. (2018) **IF: 4,743; Q1**

Sali N, **Csepregi R**, Kőszegi T, Kunsági-Máté S, Sente L, Poór M: Complex formation of flavonoids fisetin and geraldol with β -cyclodextrins. *J. Lumin.* 194 pp. 82-90., 9 p. (2018) **IF: 2,961; Q2**

Dénes T, Bartha SG, Kerényi M, Varga E, Balázs VL, **Csepregi R**, Papp N: Histological and antimicrobial study of *Ononis arvensis* L. *Acta Biol. Hung.* (1983-2018) 68: 3 pp. 321-333., 13 p. (2017) **IF: 0,439; Q3**

Kőszegi T, Sali N, Raknič M, Horváth-Szalai Z, **Csepregi R**, Zovko-Končić M, Papp N, Poór M: A novel luminol-based enhanced chemiluminescence antioxidant capacity microplate assay for use in different biological matrices. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 88: 2 pp. 153-159., 7 p. (2017) **IF: 2,269; Q2**

Patay ÉB, Sali N, Kőszegi T, **Csepregi R**, Balázs VL, Németh TS, Németh T, Papp N: Antioxidant potential, tannin and polyphenol contents of seed and pericarp of three *Coffea* species. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 9: 4 pp. 366-371., 6 p. (2016) **IF: 0,925; Q3**

Csepregi R, Bencsik T, Papp N: Examination of secondary metabolites and antioxidant capacity of *Anthyllis vulneraria*, *Fuchsia sp.*, *Galium mollugo* and *Veronica beccabunga*. *Acta Biol. Hung.* (1983-2018) 67: 4 pp. 442-446., 5 p. (2016) **IF: 0,506; Q3**

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó egyéb konferencia előadások, poszterek

Faisal Z, Vörös V, **Csepregi R**, Kőszegi T, Lemli B, Kunsági-Máté S, Bálint M, Hetényi Cs, Sente L, Poór M: Interactions of zearalenone and its reduced metabolites with serum albumins and cyclodextrins. In: 5th International Cholnoky Symposium. Magyarország-Pécs. (2019) pp. 9-9., 1 p.

Faisal Z, Vörös V, Derdák D, Lemli B, Bálint M, Hetényi Cs, **Csepregi R**, Sueck F, Humpf HU, Cramer B, Poór M: Ochratoxin A és 2'R-Ochratoxin A kölcsönhatásainak vizsgálata szérumban albuminnal. In: [Magyar, Toxikológusok Társasága] TOX'2018 Tudományos Konferencia Program. Magyarország-Lillafüred. (2018) pp. 48-48. Paper: S2-7, 1 p.

Poór M, Faisal, Z, **Csepregi R**, Lemli B, Kunsági-Máté S, Sente L: Mikotoxin-ciklodextrin kölcsönhatások vizsgálata és gyakorlati hasznosíthatóságuk In: [Magyar, Toxikológusok Társasága] (szerk.) TOX'2018 Tudományos Konferencia Program. Magyarország-Lillafüred. (2018) pp. 46-46. Paper: S2-6, 1 p.

Papp N; **Csepregi R**, Dénes T, Tóth M, Bartha SG, Gyergyák K, Czégényi D: Relevance of Transylvanian plants in the European ethnomedicine. In: 9th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries. 9th CMAPSEEC. Bulgária-Plovdiv. (2016) Paper: SL 3.

Csepregi R, Kocsis M, Papp N: Erdélyi népgyógyászatban alkalmazott gyógynövények fitokémiai és hisztológiai vizsgálata (2016) Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoport 281. szakülése, Pécs, 2016.

Csepregi R, Sali N, Kőszegi T, Papp N: Erdélyi népgyógyászatban alkalmazott gyógynövények antioxidáns hatásának vizsgálata (2015) Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoport 275. szakülése, Pécs, 2015.

Vörös V, Faisal Z, **Csepregi R**, Kőszegi T, Poór M: Testing the interactions of deoxynivalenol, patulin, and T-2 toxin with human serum albumin. In: 41st Mycotoxin Workshop. Magyarország. (2019) pp. 120-120. Paper: P54, 1 p.

Faisal Z, **Csepregi R**, Kőszegi T, Sente L, Poór M: Effects of native and chemically modified beta-cyclodextrins on the in vitro cytotoxicity of zearalenone. In: 41st Mycotoxin Workshop. Magyarország. (2019) pp. 121-121. Paper: P55, 1 p.

Vörös V, Faisal Z, Derdák D, Lemli B, Bálint M, Hetényi C. **Csepregi R**, Poór M: Dihidrocitrinon kölcsönhatásának vizsgálata szérumban. In: [Magyar Toxikológusok Társasága] (szerk.) TOX'2018 Tudományos Konferencia Program. Magyarország-Lillafüred. (2018) pp. 140-140. Paper: C5-16, 1 p.

Csepregi R, Temesfői V, Kurdi C, Szélig Á, Laki A, Kőszegi T: Detection and identification of cultured tumor cells in microfluidic device. In: Evi, S Lianidou; Klaus, Pantel (szerk.) Advances in Circulating Tumour Cells [ACTC]: Liquid Biopsy in Clinical Practice. Görögország-Rodosz. (2017) pp. 199-199., 1 p.

Temesfői V, Szélig Á, Kurdi C, **Csepregi R**, Kőszegi T, Laki A: Microfluidic device designed for capturing microparticles; a model for isolation of circulating tumor cells. In: Evi, S Lianidou; Klaus, Pantel (szerk.) Advances in Circulating Tumour Cells [ACTC]: Liquid Biopsy in Clinical Practice. Görögország-Rodosz. (2017) pp. 196-196., 1 p.

Csepregi R, Kocsis M, Bartha SG, Gyergyák K, Papp N: Az *Anthyllis vulneraria*, *Galium mollugo* és *Veronica beccabunga* elterjedése és etnobotanikai adatai Erdélyben (2016) XI. Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében, 2016. február 12-14, Budapest.

Csepregi R, Csepregi K, Papp N, Kocsis M: Study of polyphenols and antioxidant activity of Transylvanian medicinal plants. In: 9th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries. Bulgária-Plovdiv. (2016) Paper: PP145

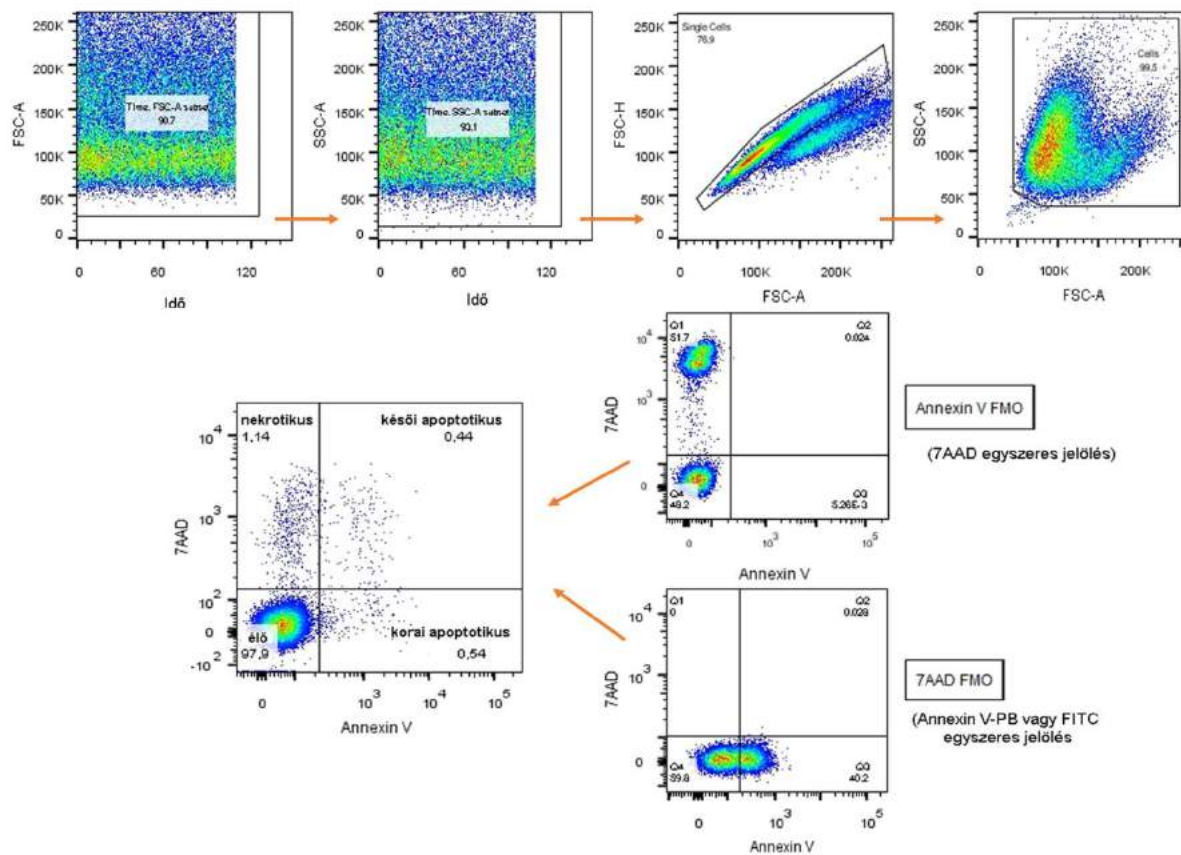
Az értekezés alapját képező közlemények összesített impakt faktora: 12,43

A publikációk összesített impakt faktora: 69,86

Független citáció: 98

Hirsch index: 7

X. MELLÉKLETEK



M1. ábra. A háttér fluoreszcencia meghatározására alkalmazott FMO (fluoreszcencia mínusz egy) kontrollok stratégiájára alkalmazott példa ábra

M1. táblázat. *Anthyllis vulneraria*, *Fuchsia magellanica*, *Fuchsia triphylla* és *Lysimachia nummularia* kivonatok összetételének HPLC-MS/MS eredményei

Szám	t _R (perc)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmens ionok (m/z)	Kísérleti jellemzés ^a	A vegyületek jelenléte és relatív mennyisége (%)								Hiv.	
						a növényi kivonatokban ^b									
						Av E ^c	Av V ^c	Fm E ^c	Fm V ^c	Ft E ^c	Ft V ^c	Ln E ^c	Ln V ^c		
1	2,0	315	343	179; 135	kávésav-származék	0,1									[232]
2	2,2	306	533; 375;	217; 173; 149	cinnamoil-kininsav-származék		0,3								[232]
3	2,5	315	341 (683)	179; 149; 135	kaffeoil-O-hexozid (dimer)	0,2		0,3					0,2		[233]
4	2,6	265; 312	337	267; 191; 163; 149; 135	5-p-kumaroil kininsav				0,2	0,1	0,1				[232]
5	3,2	288sh; 311	639; 353	191	kaffeoil-kininsav-származék	0,3	0,9								[232]
6	7,1	272	331	169; 125	galloil hexozid						0,2		0,2		[234]
7	9,5	311	355	191	kumaroil glukarát izomer		0,1						2,9		[235]
8	10,1	298sh; 320	371	209; 191; 179	kaffeoil-kininsav-származék		0,5								[232]
9	10,5	260	611	305	n.a.							2,0	1,8	-	
10	10,5	298; 310	355	209; 191; 163	kumaroil glukarát izomer		0,5						1,3		[235]
11	10,6	298; 320	549	387; 369; 267; 249; 137	fahéjsav származék		0,3								[236]
12	10,6	298	331	169; 125	galloil hexozid								2,6		[234]
13	10,9	300	301	168; 150; 125	galloil pentozid		0,2								[234]
14	11,9	282sh; 307	355 (711)	271; 209; 191	kumaroil glukarát izomer (dimer)								3,4		[235]
15	12,6	283sh; 312	355	271; 209; 191	kumaroil glukarát izomer		1,9					5,0	6,9		[235]
16	13,0	290; 328sh	297; (595)	179; 161; 135	kávésav származék (dimer)			2,0	2,4		4,0				[232]
17	13,0	296	575	413; 351; 267; 249; 163; 113	kumársav származék		0,5								[232]
18	13,1	310	385	209; 191	feruloil glukarát							2,2	3,9		[235]

Szám	t _R (perc)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmens ionok (m/z)	Kísérleti jellemzés ^a	A vegyületek jelenléte és relatív mennyisége (%) a növényi kivonatokban ^b									
						Av	Av	Fm	Fm	Ft	Ft	Ln	Ln		
						E ^c	V ^c	E ^c	V ^c	E ^c	V ^c	E ^c	V ^c		
19	13,2	255; 350	787	625; 462; 301; 299	kvercetin 3-O-hexozil-hexozil-7-O-hexozid		1,0								[237]
20	13,3	283sh; 312	385	209; 191	feruloil glukarát		0,7					3,0	10,2		[235]
21	13,5	265; 349	771	609; 462; 301; 299; 285; 284; 283; 179	kvercetin 3-O-hexozil-dezoxihexozil-7-O-hexozid	2,2	1,0								[237]
22	13,8	288sh; 312	385	271; 209; 191; 163; 146; 119	feruloil glukarát		3,0						2,3		[235]
23	13,9	265; 349	771	609; 446; 445; 285; 284; 283; 179	kempferol 3-O-hexozil-hexozil-7-O-hexozid	2,6	0,9								[237]
24	13,9	276	475; 453	-	n.a.						2,5				-
25	14,4	264; 351	755	593; 446; 284; 283	kempferol 3-O-hexozil-dezoxihexozil-7-O-hexozid	2,5	2,9								[238]
26	15,0	272	651	399; 325; 163	n.a.		1,9			2,9					-
27	15,2	256; 354	625	463; 462; 301; 299	kvercetin 3-O-hexozil-7-O-hexozid	1,6	1,2								[238]
28	15,7	257; 352	595	462; 433; 301; 299; 271	kvercetin 3-O-pentozil-7-O-hexozid	0,7	1,2								[234]
29	15,8	268	305	225; 147; 135	n.a.				0,8	0,5		0,9	1,3		-
30	16,2	265; 347	609	447; 446; 285; 283	kempferol 3-O-hexozil-7-O-hexozid	1,7	0,5								[234]
31	16,4	278	449	357; 275	n.a.							1,5	0,9		-
32	16,5	288sh; 321	575	443; 267; 249; 193; 175	1,3-O-diferuloilglicerol pentozid		0,7								[239]
33	16,6	254; 354	639	519; 477; 461; 315; 314; 313; 299; 151	izoramnetin 3-O-hexozil-7-O-hexozid	4,6	1,4								[240]
34	17,2	268; 295sh	693	477; 345; 327; 315; 300; 207; 183; 165	n.a.						1,8				-

Szám	t _R (perc)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmens ionok (m/z)	Kísérleti jellemzés ^a	A vegyületek jelenléte és relatív mennyisége (%) a növényi kivonatokban ^b								
						Av	Av	Fm	Fm	Ft	Ft	Ln	Ln	
						E ^c	V ^c	E ^c	V ^c	E ^c	V ^c	E ^c	V ^c	
35	17,4	252; 269sh; 332	443	267; 249; 193; 175; 149; 134; 113	1,3-O-diferuloilglicerol	5,1	4,4							[239]
36	17,5	252; 269sh; 352	963	801; 625	flavonoid		0,6							[236]
37	18,0	260	197		n.a.					3,2				-
38	18,0	268; 350	639	319; 301; 283; 239; 213; 203; 197; 157; 142; 130; 116; 109	flavonoid	6,2	6,5							[236]
39	18,1	276	521	337; 191; 163	kumaroil-kininsav- származék						1,2	0,7		[232]
40	18,2	266; 350	625	463; 300; 271; 255; 243; 179	kvercetin 3-O-hexozil- hexozid	2,9	2,5							[240]
41	19,2	274	387 (775)	169; 151; 124	galluszsav-származék (dimer)			0,4	0,2					[239]
42	19,3	274	537	271; 211; 169; 151; 124	galluszsav-származék			0,2	0,1					[239]
43	19,3	266; 357	625	479; 306	miricetin 3-O-dezoxihexozil- hexozid						2,3	1,5		[241]
44	19,3	266; 355	609	429; 285; 284; 255; 227	kempferol 3-O-hexozil- hexozid	1,2	2,6							[234]
45	19,4	267; 357	479	316	miricetin 3-O-hexozid						1,1	0,8	-	
46	19,5	262; 355	615	463; 301; 300; 271; 169	kvercetin galloil hexozid			0,4	0,4	1,8	1,0			[240]
47	19,6	264; 352	639	459; 315; 314; 257	izoramnetin 3-O-hexozil- hexozid		1,9							[242]
48	19,8	266; 331	593	429; 284; 255; 227	kempferol 3-O- dezoxihexozil-hexozid	2,7	1,7							[234]
49	20,2	260; 354	463	317; 316	miricetin 3-O-dezoxihexozid						22,0	17,2		[243]

Szám	t _R (perc)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmens ionok (m/z)	Kísérleti jellemzés ^a	A vegyületek jelenléte és relatív mennyisége (%)								Hiv,
						a növényi kivonatokban ^b								
						Av E ^c	Av V ^c	Fm E ^c	Fm V ^c	Ft E ^c	Ft V ^c	Ln E ^c	Ln V ^c	
50	20,3	255; 293sh; 359	615	301	kvercetin galloil hexozid			0,1	0,1					[240]
51	20,5	259; 356	477	301; 283; 255; 179; 151; 121	kvercetin glükuronid			0,5	0,2	0,6	0,6			[240]
52	20,6	257; 268sh; 356	433	301; 300	kvercetin 3-O-pentozid			0,1	0,1					[240]
53	20,7	257; 268sh; 356	615	301	kvercetin galloil hexozid			0,9	0,5					[244]
54	20,7	260; 353	463	317; 316	miricetin 3-O-dezoxihexozid							2,4		[243]
55	20,8	257; 355	463	301; 300; 271; 255; 243; 179; 163; 151	kvercetin 3-O-hexozid	3,6	4,9	0,1	0,1	0,6	0,5			[234]
56	20,9	266; 350	579	463; 315; 313	izorhamnetin-3-O-pentozil-7- O-pentozid	5,0	3,8							[240]
57	20,9	257; 355	609	463; 301; 300; 299	kvercetin 3-O-desoxihexozil- 7-O-hexozid			0,1	0,1	0,2	0,5	0,8	1,8	[241]
58	21	257; 355	599	447; 313; 285; 169	kempferol galloil hexozid			0,1	0,1					[236]
59	21,3	256; 356	433	300; 271; 255; 151	kvercetin 3-O-pentozid	2,4	2,0	0,2	0,1	0,4	0,4			[240]
60	21,5	254; 368	301	284; 245; 229; 201; 185; 145; 129; 117	ellágsav			0,3	0,1	1,1	0,6			[244]
61	21,7	266; 350	447	284; 255; 227; 151	kempferol 3-O-hexozid	2,6	2,2	0,2	0,1					[234]
62	21,7	266; 350	447	301; 300; 271; 255; 179; 151	kvercetin 3-O-dezoxihexozid					1,1	1,2			[240]
63	21,8	266; 332	705	437; 407; 325; 245; 231; 199; 163; 121	n.a.	2,4	1,8							-

Szám	t _R (perc)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmens ionok (m/z)	Kísérleti jellemzés ^a	A vegyületek jelenléte és relatív mennyisége (%)								Hiv,
						a növényi kivonatokban ^b								
						Av E ^c	Av V ^c	Fm E ^c	Fm V ^c	Ft E ^c	Ft V ^c	Ln E ^c	Ln V ^c	
64	21,8	266; 350	521	331; 271; 211; 169	galloil hexozid-származék			0,5	0,3					[234]
65	21,9		517	267; 249; 205; 161; 113	n.a.	2,0	1,2							-
66	22,0	266; 347	447	284; 255; 227	kempferol 3-O-hexozid			0,4	0,2					[234]
67	22,0	255; 350	477	315; 314; 285; 271; 257; 243	izoramnetin 3-O-hexozid	1,8	4,2							[245]
68	22,0	264; 340	477	331; 317	miricetin dezoxihexozid- származék							2,8	3,4	[246]
69	22,0	264; 340	447	331; 317	miricetin-származék							2,5	1,0	[246]
70	22,3	266; 340	639	477; 459; 315; 314; 267	izoramnetin 3-O-hexozil- hexozid	1,1	2,6							[245]
71	22,3	266; 347	417	285; 284; 255; 227	kempferol 3-O-pentozid			0,3	0,2					[234]
72	22,4	267; 328	727	551; 491; 415; 267; 249	ferulasav-származék	2,0								[247]
73	22,4		623	431; 371; 345; 317; 301; 299	n.a.							0,8	0,5	-
74	22,5	267; 328	727	551; 415; 267; 183	ferulasav-származék		1,4							[247]
75	22,8	255; 266sh; 334	447	314; 285; 271; 257; 243	izoramnetin 3-O-pentozid		1,3							[245]
76	22,9	266; 351	599	447; 301; 300; 179; 151	kvercetin 3-O- dezoxihexozid-származék					0,1	0,1			[240]
77	23,4	266; 348	623	443; 299; 298; 283; 271	ramnocitrin 3-O-dihexozid	3,8	3,2							[247]
78	23,7	268; 339	609	315; 314; 193	izoramnetin 3-O-pentozil- hexozid	0,6	1,5							[245]
79	23,8	268; 329	799	623; 485; 397; 299; 298	n.a.	2,1	0,7							-
80	24,8		477	301; 267; 249; 227; 209; 183; 165; 113	ellágsav-származék		0,6							[244]
81	24,9	250; 370	531	301; 300	kvercetin-származék					0,1	0,5			[240]

Szám	t_R (perc)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmens ionok (m/z)	Kísérleti jellemzés ^a	A vegyületek jelenléte és relatív mennyisége (%) a növényi kivonatokban ^b								Hiv.
						Av	Av	Fm	Fm	Ft	Ft	Ln	Ln	
						E ^c	V ^c	E ^c	V ^c	E ^c	V ^c	E ^c	V ^c	
82	24,9	266; 344	593	413; 299; 298; 283	ramnocitrin 3-O-hexozil- pentozid	1,1	0,7							[247]

^a A vegyületszámok és a retenciós idők (t_R) az UV kromatogramokra vonatkoznak, melyek lentebb megtalálhatóak (M1-M8).

^b Relatív mennyiség: Az adott vegyület csúcs alatti területének %-a az összes vegyület összesített csúcs alatti területéből lett számolva.

^c Rövidítések: AvE: *Anthyllis vulneraria* 50%-os (v/v) etanolos kivonat, AvV: *Anthyllis vulneraria* vizes kivonat, FmE: *Fuchsia magellanica* 50% (v/v) etanolos kivonat, FmV: *Fuchsia magellanica* vizes kivonat, FtE: *Fuchsia triphylla* 50%-os (v/v) etanolos kivonat, FtV: *Fuchsia triphylla* vizes kivonat, LnE: *Lysimachia nummularia* 50%-os (v/v) etanolos kivonat, LnV: *Lysimachia nummularia* vizes kivonat, n.a. : nem azonosított.

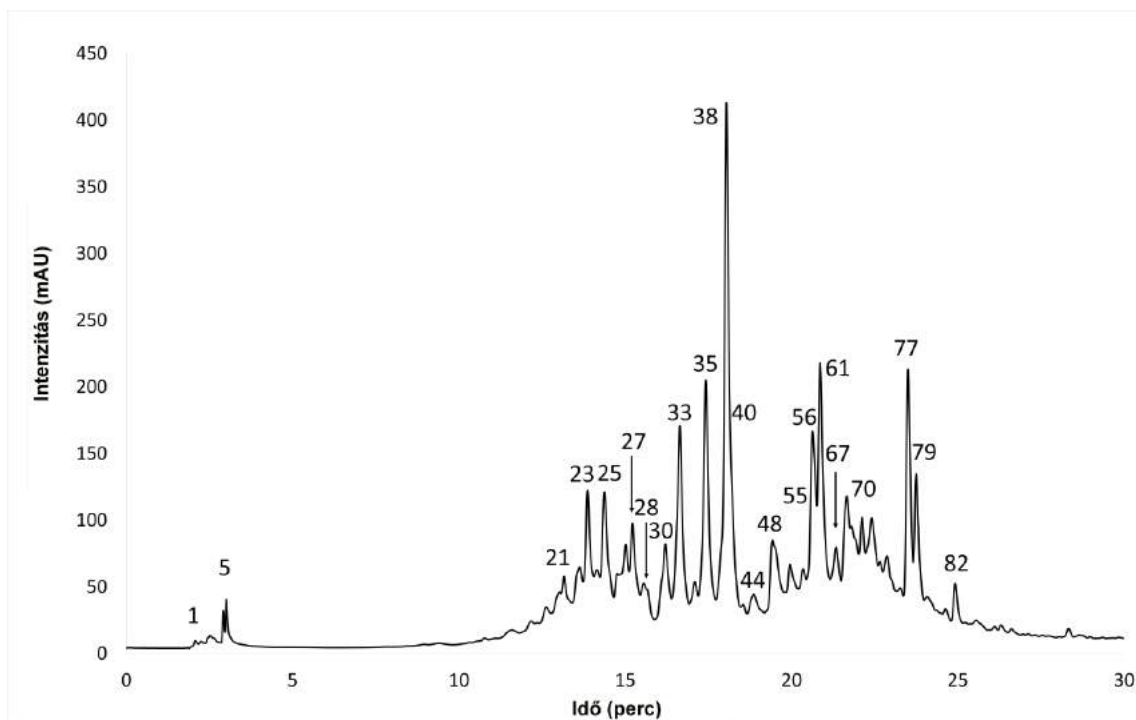
M2. táblázat. Antocianinok azonosítása *Fuchsia magellanica* és *Fuchsia triphylla* kivonataiból HPLC-MS/MS készülékkel

Szám	t_R (perc)	[M+H] ⁺ (m/z)	Fragmens ionok (m/z)	Kísérleti jellemzés ^a	A vegyületek jelenléte és relatív mennyisége (%) a növényi kivonatokban ^b				Hiv.
					FmE ^c	FmV ^c	FtE ^c	FtV ^c	
					I	2,0	767	453; 153	
II	2,7	611	449; 287	cianidin dihexozid	3.0	18.3			[248,249]
III	2,9	783	303	antocianin (n.a.)			5.9		-
IV	9,1	625	463; 301	peonidin dihexozid	15.7				[248,249]
V	10,3	625	463; 301	peonidin dihexozid	18.9	39.9	5.3	5.4	[248,249]
VI	10,7	487	325; 185	antocianidin hexozid		4.2			-
VII	11,4	441	249	antocianin (n.a.)				9.6	-
VIII	11,8	411	249	antocianin (n.a.)			6.1	9.6	-

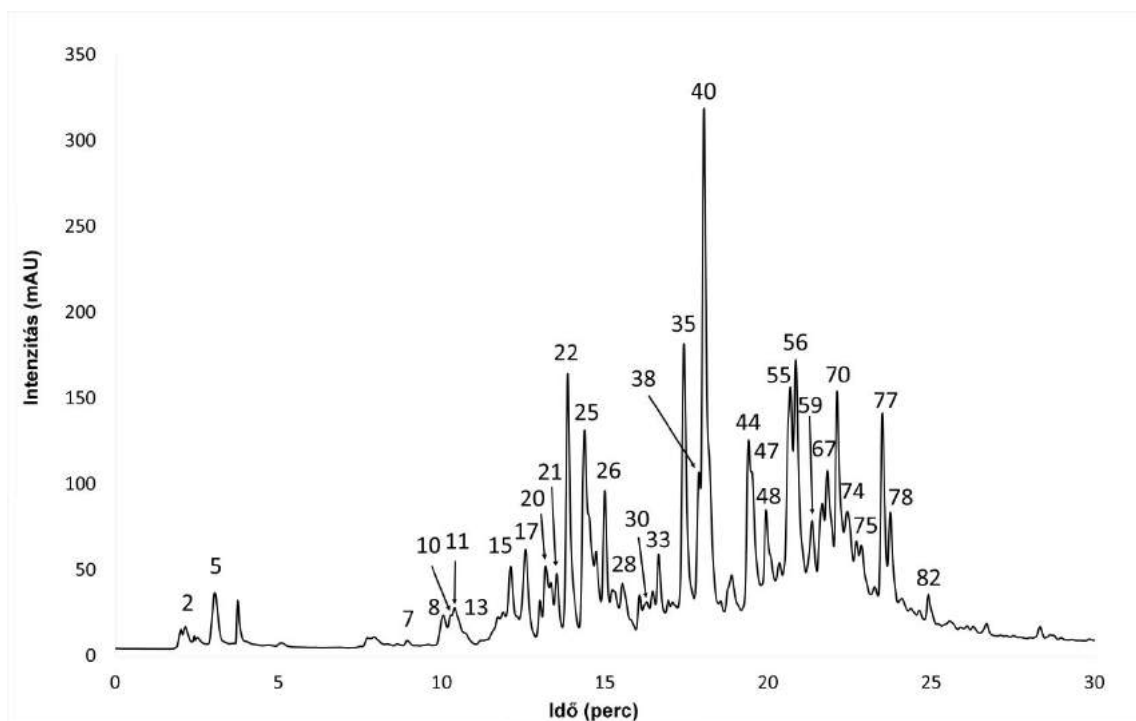
^a A vegyületszámok és a retenciós idők (t_R) az UV kromatogramokra vonatkoznak, melyek lentebb megtalálhatóak (M3-M6).

^b Relatív mennyiség: Az adott vegyület területének %-a az összes vegyület összesített területéből lett számolva.

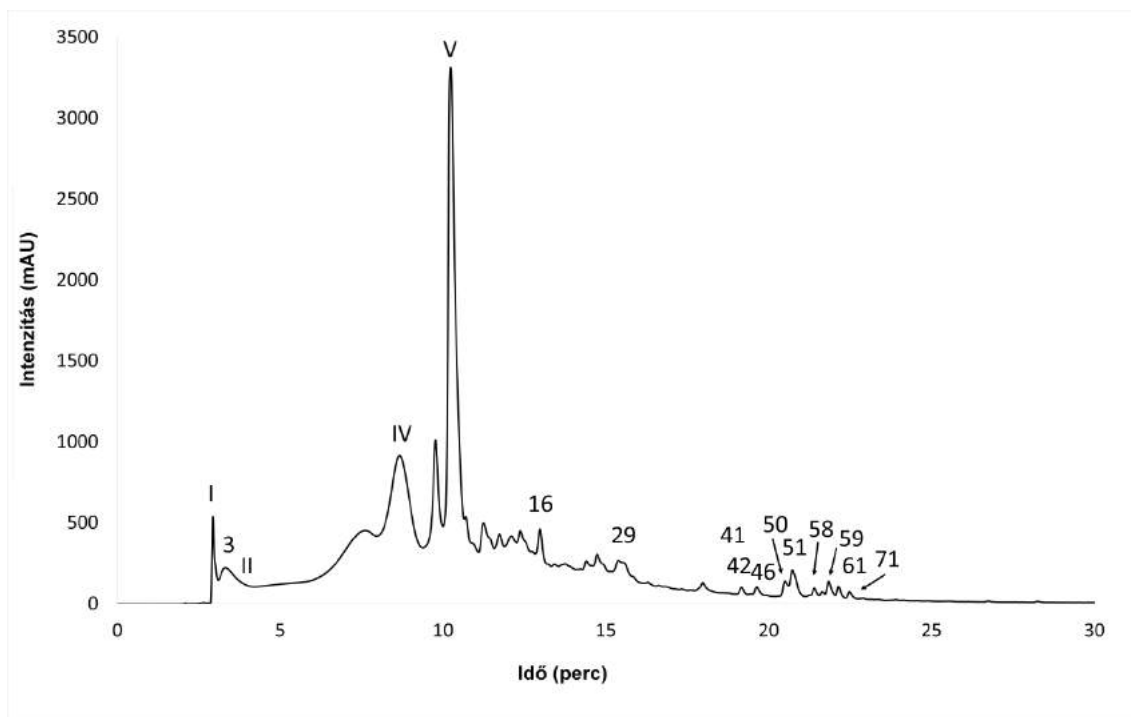
^c Rövidítések: FmE: *Fuchsia magellanica* 50%-os (v/v) etanolos kivonat, FmV: *Fuchsia magellanica* vizes kivonat, FtE: *Fuchsia triphylla* 50%-os (v/v) etanolos kivonat, FtV: *Fuchsia triphylla* vizes kivonat.



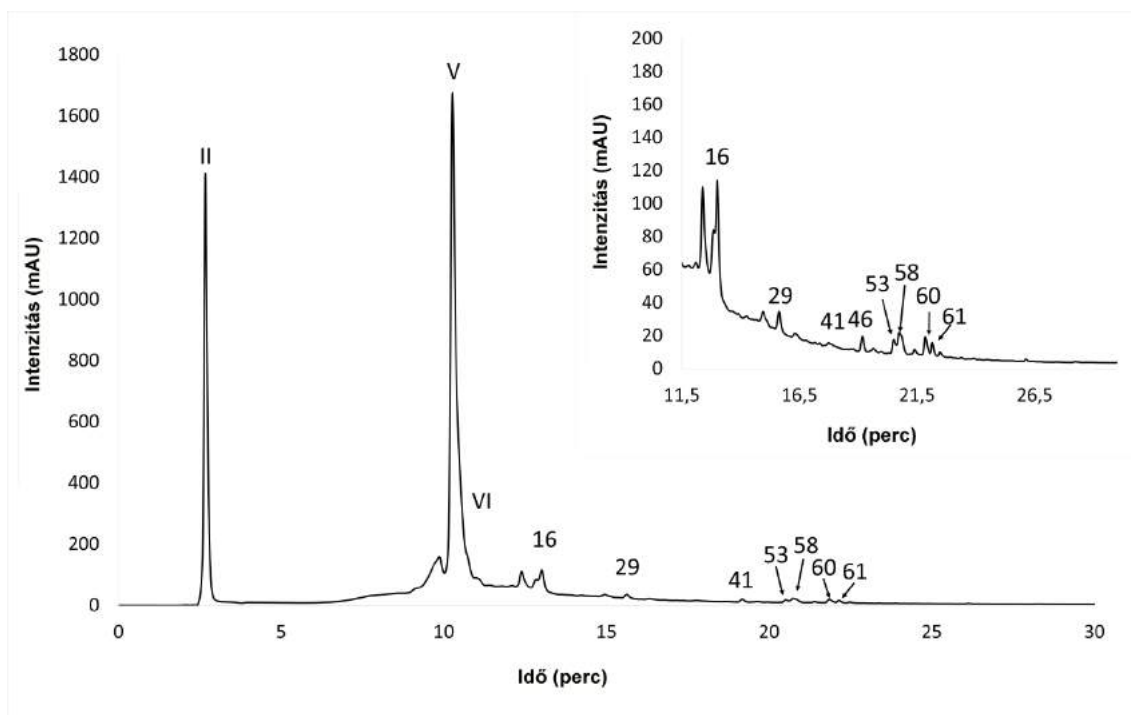
M2. ábra. Az *A. vulneraria* 50%-os (v/v) etanolos kivonatának HPLC-DAD kromatogramja, detektálási hullámhossz: 280 nm. A csúcsok számozása az M1. táblázatban bemutatott adatokra vonatkozik



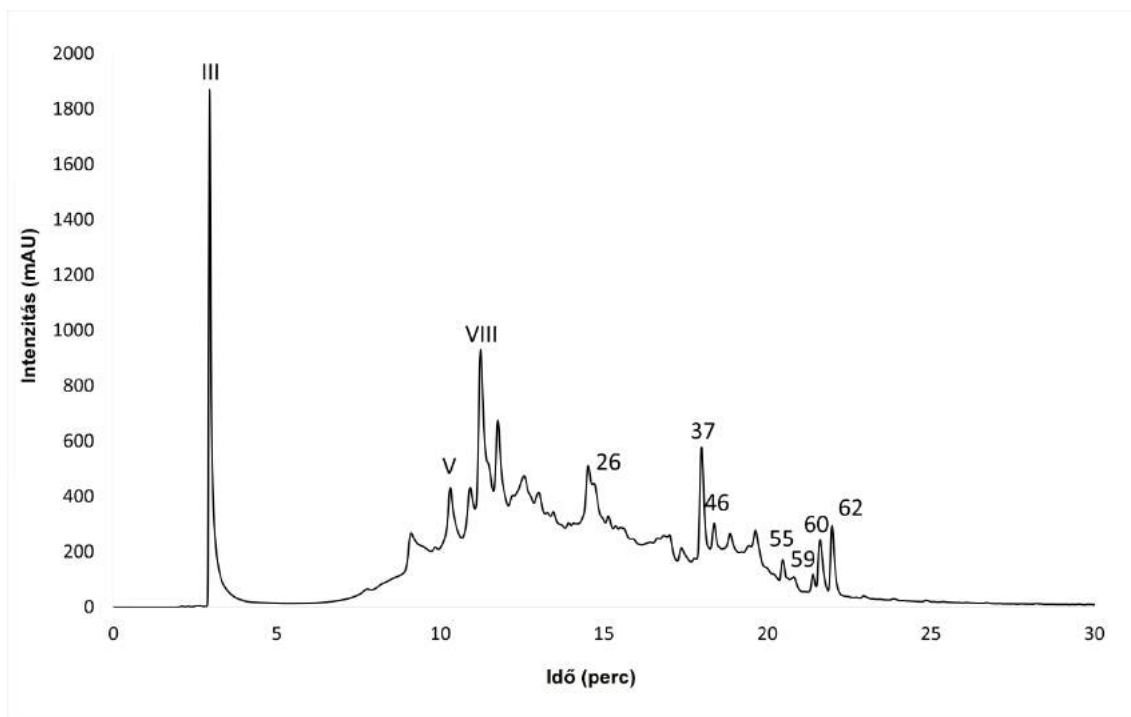
M3. ábra. Az *A. vulneraria* vizes kivonatának HPLC-DAD kromatogramja, detektálási hullámhossz: 280 nm. A csúcsok számozása az M1. táblázatban bemutatott adatokra vonatkozik



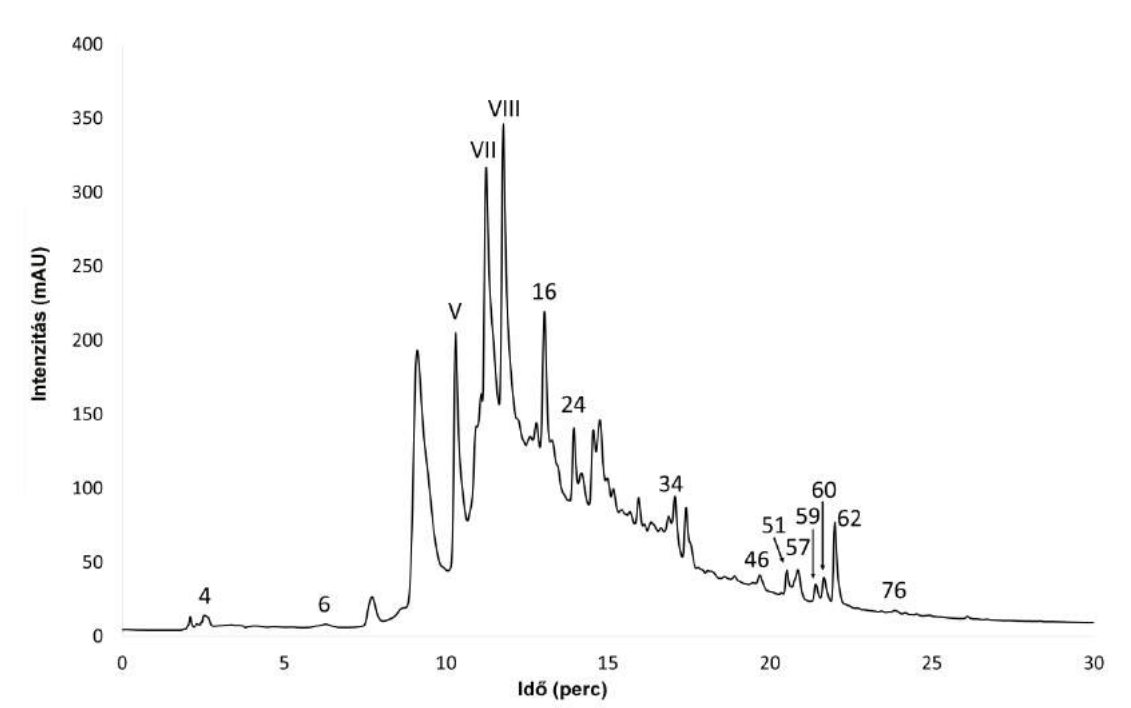
M4. ábra. A *F. magellanica* 50%-os (v/v) etanolos kivonatának HPLC-DAD kromatogramja, detektálási hullámhossz: 280 nm. A csúcsok számozása az M1. és M2. táblázatban bemutatott adatokra vonatkozik



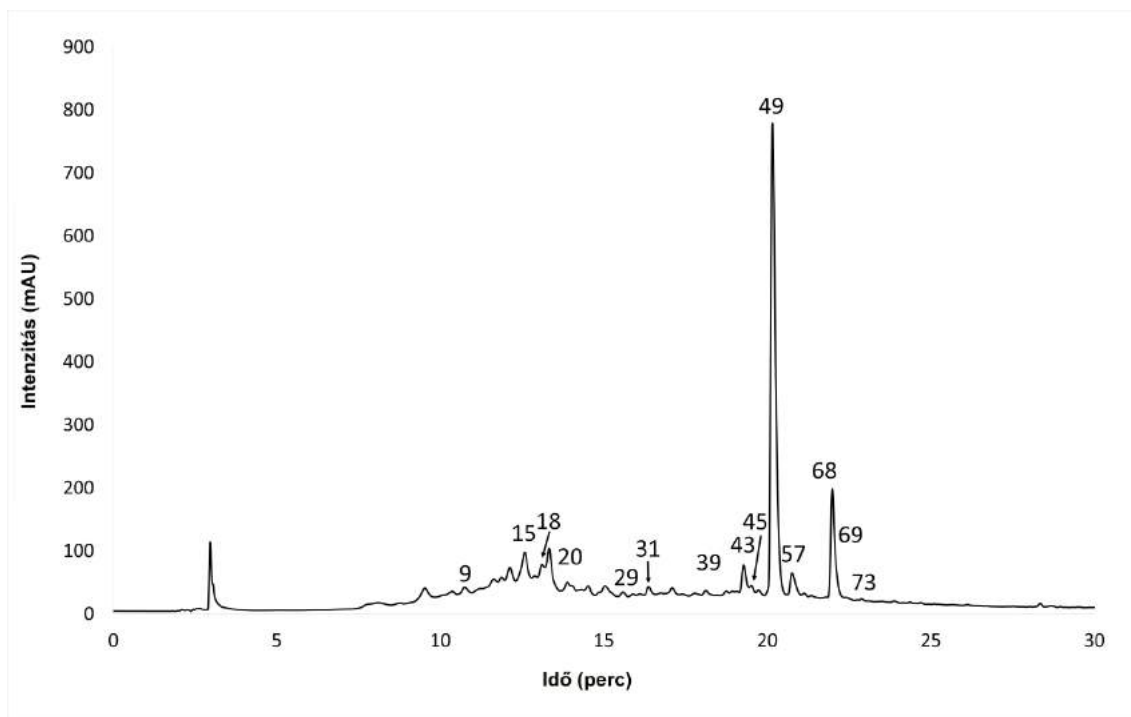
M5. ábra. A *F. magellanica* vizes kivonatának HPLC-DAD kromatogramja, detektálási hullámhossz: 280 nm. A csúcsok számozása az M1. és M2. táblázatban bemutatott adatokra vonatkozik



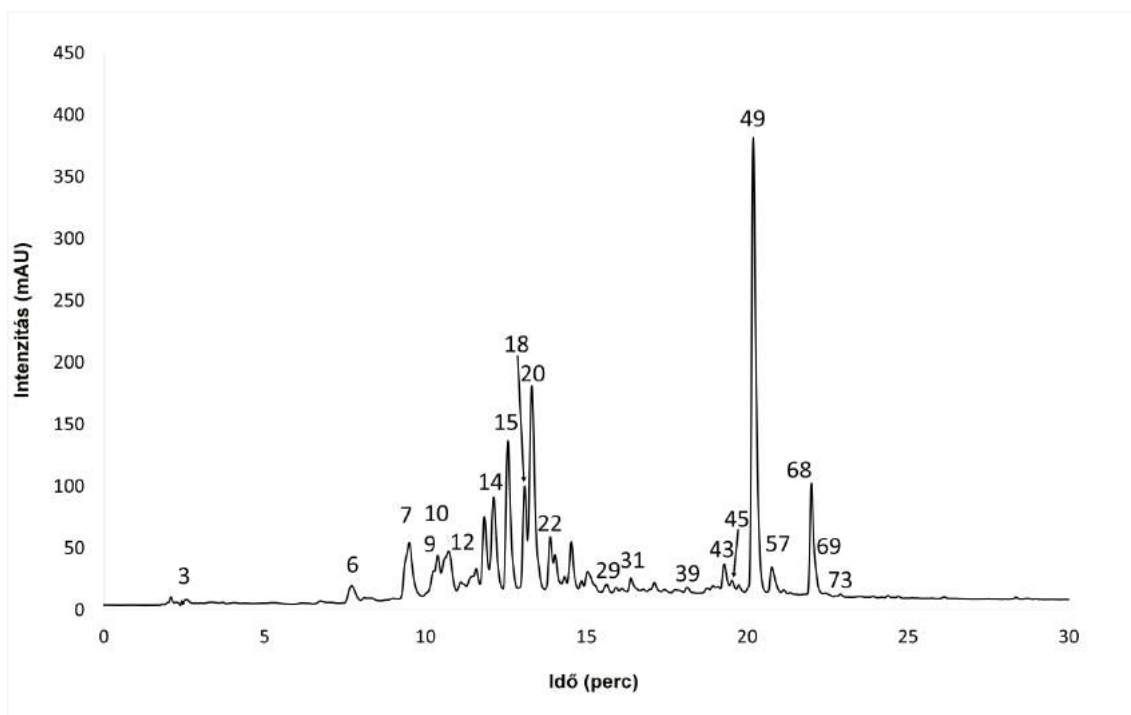
M6. ábra. A *F. triphylla* 50%-os (v/v) etanolos kivonatának HPLC-DAD kromatogramja, detektálási hullámhossz: 280 nm. A csúcsok számozása az M1. és M2. táblázatban bemutatott adatokra vonatkozik



M7. ábra. A *F. triphylla* vizes kivonatának HPLC-DAD kromatogramja, detektálási hullámhossz: 280 nm. A csúcsok számozása az M1. és M2. táblázatban bemutatott adatokra vonatkozik

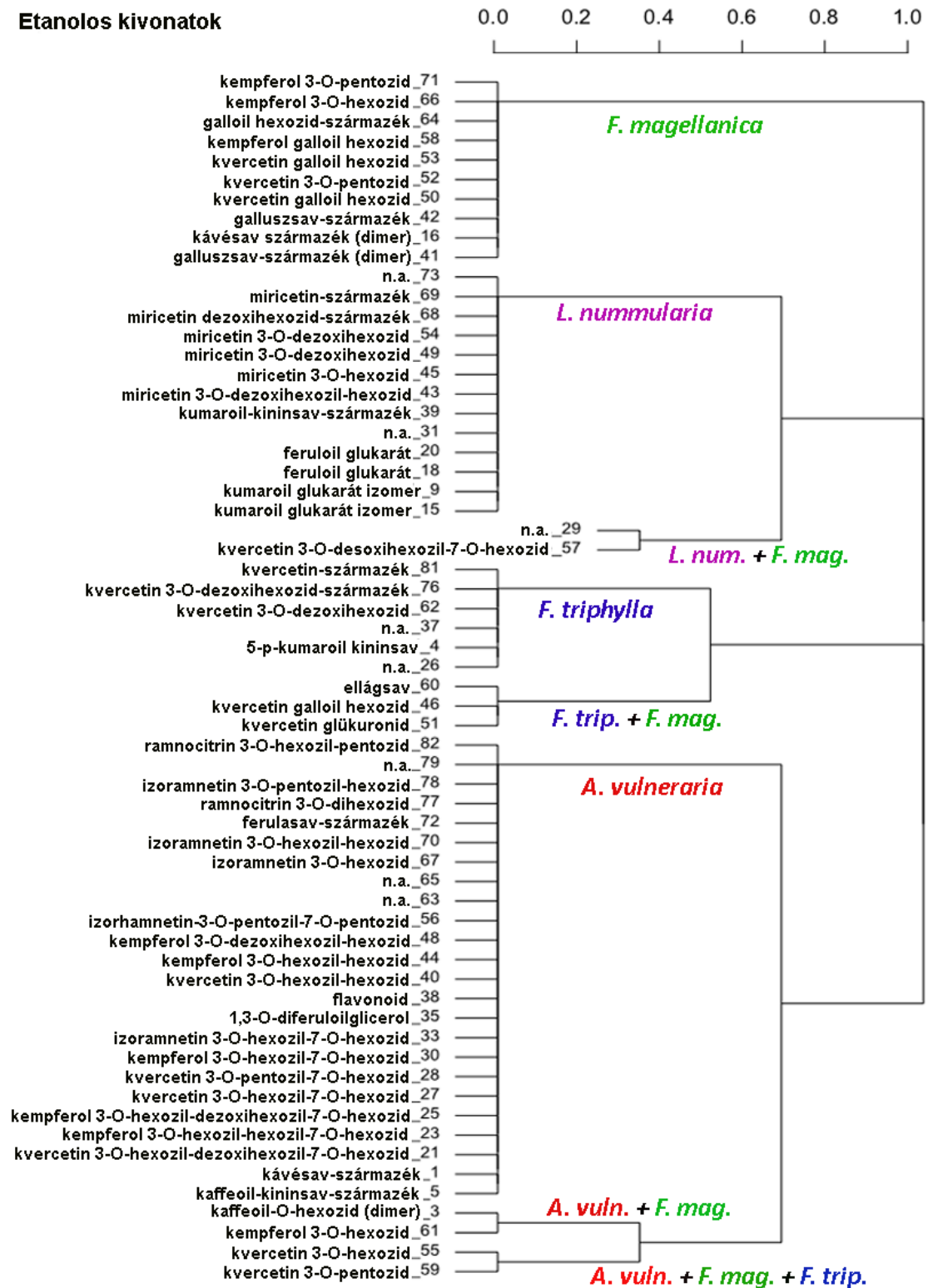


M8. ábra. A *L. nummularia* 50%-os (v/v) etanolos kivonatának HPLC-DAD kromatogramja, detektálási hullámhossz: 280 nm. A csúcsok számozása az M1. táblázatban bemutatott adatokra vonatkozik

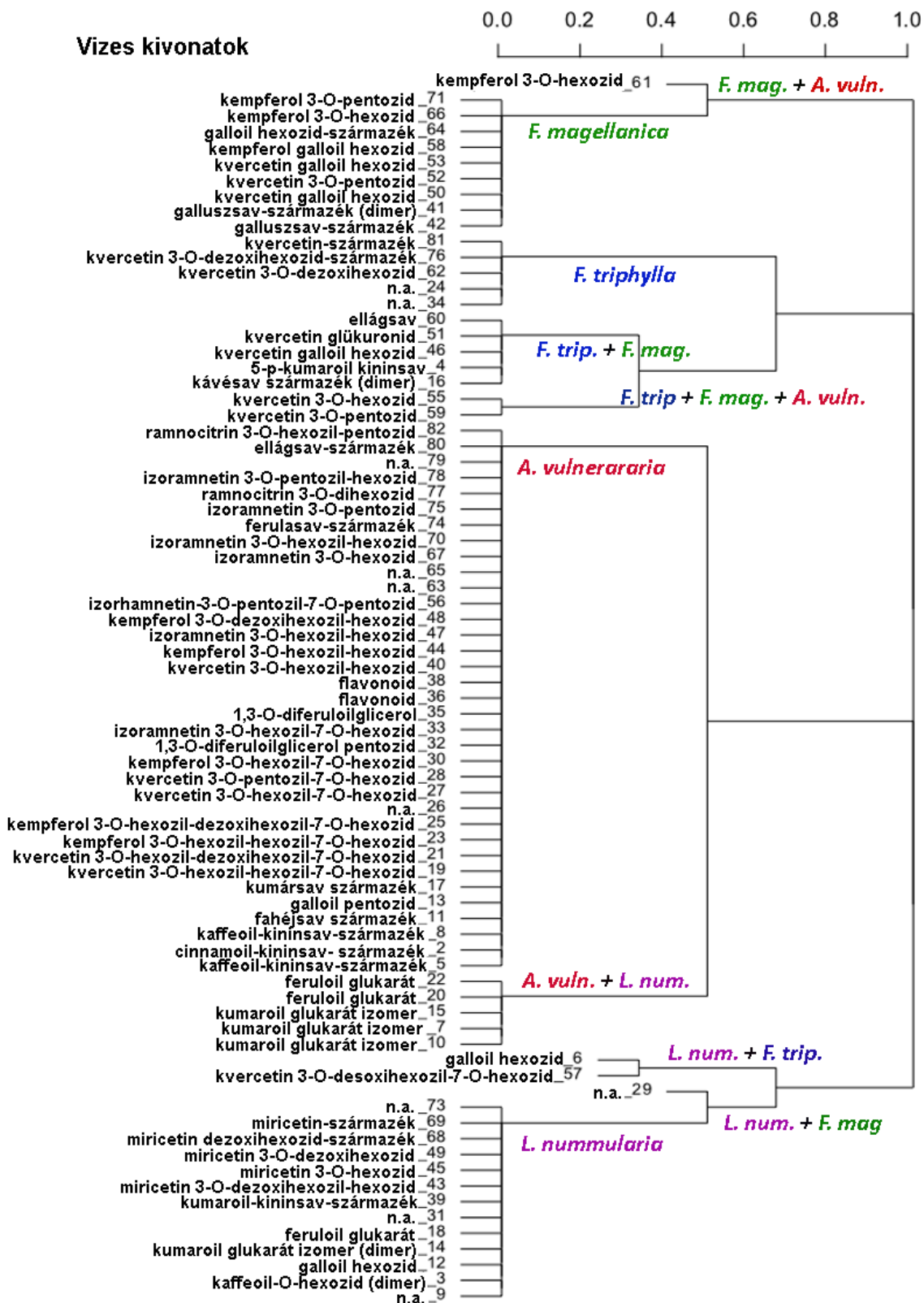


M9. ábra. A *L. nummularia* vizes kivonatának HPLC-DAD kromatogramja, detektálási hullámhossz: 280 nm. A csúcsok számozása az M1. táblázatban bemutatott adatokra vonatkozik

Etanolos kivonatok



M10. ábra. Összesített hatóanyagok előfordulása a növények etanolos kivonataiban dendrogram formájában



M11. ábra. Összesített hatóanyagok előfordulása a növények vizes kivonataiban dendrogram formájában

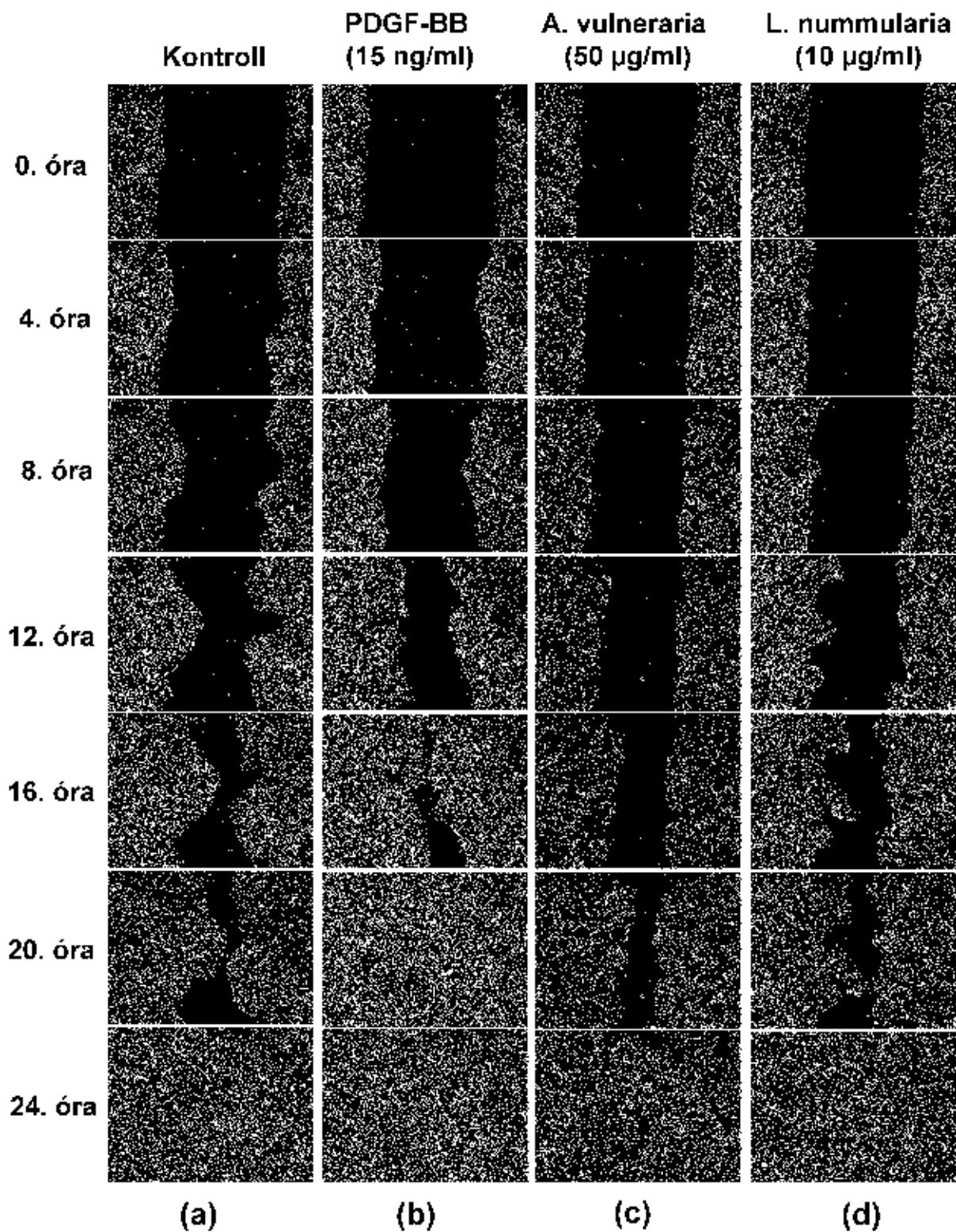
		Életképesség (%) ± szórás					
Koncentráció (µg/ml)		ATP		Nukleinsav		Fehérje	
		3T3	HaCaT	3T3	HaCaT	3T3	HaCaT
1,5% Etanol		94,67 ± 6,70	100,00 ± 3,52	95,51 ± 5,24	100,00 ± 3,61	95,67 ± 3,74	100,00 ± 3,12
Kontroll	0	100,00 ± 4,03	100,00 ± 3,66	100,00 ± 3,49	100 ± 4,72	100 ± 4,53	100 ± 5,03
<i>A. vulneraria</i>	500	96,11 ± 5,66	95,13 ± 3,62	95,52 ± 6,56	96,52 ± 3,94	100,05 ± 8,26	102,30 ± 7,15
	1000	86,88 ± 5,49	88,02 ± 4,08	79,42 ± 5,19	88,96 ± 3,60	88,37 ± 4,51	91,14 ± 4,97
	1500	65,18 ± 4,32	73,38 ± 4,68	61,92 ± 4,87	72,70 ± 4,36	67,81 ± 6,52	77,93 ± 6,08
	2000	21,71 ± 5,75	64,31 ± 6,27	30,98 ± 3,40	68,98 ± 5,09	36,04 ± 4,42	72,20 ± 4,44
	2500	1,86 ± 0,53	47,52 ± 5,06	16,42 ± 3,51	50,51 ± 3,66	25,38 ± 2,65	53,25 ± 5,60
<i>F. magellanica</i>	50	92,89 ± 4,32	91,72 ± 4,75	91,43 ± 5,18	91,53 ± 4,25	90,49 ± 5,71	92,28 ± 4,35
	120	79,87 ± 4,74	79,01 ± 4,04	76,65 ± 4,22	79,32 ± 3,74	75,60 ± 3,77	81,45 ± 3,90
	250	41,32 ± 6,41	45,18 ± 3,91	57,61 ± 5,20	61,43 ± 3,18	62,52 ± 6,48	68,84 ± 5,09
	500	8,87 ± 2,17	24,14 ± 2,44	35,65 ± 2,32	48,73 ± 5,06	40,54 ± 3,15	51,84 ± 3,80
	800	2,03 ± 0,58	10,01 ± 2,34	28,29 ± 2,13	38,65 ± 3,62	30,29 ± 4,02	40,42 ± 4,89
<i>F. triphylla</i>	50	86,08 ± 4,27	93,05 ± 5,41	90,21 ± 6,47	93,82 ± 4,35	91,47 ± 4,75	95,31 ± 4,94
	120	75,48 ± 4,35	81,53 ± 4,95	78,50 ± 9,31	86,82 ± 5,07	76,79 ± 6,28	87,14 ± 5,58
	250	44,53 ± 4,81	72,19 ± 5,20	57,46 ± 4,38	74,85 ± 4,57	61,32 ± 3,17	76,65 ± 5,57
	500	34,95 ± 4,17	44,87 ± 4,79	46,22 ± 3,07	58,82 ± 4,18	47,81 ± 4,05	61,11 ± 5,35
	800	2,22 ± 0,88	20,19 ± 3,20	28,64 ± 2,74	43,37 ± 2,79	27,43 ± 3,66	48,22 ± 3,51
<i>L. nummularia</i>	250	80,10 ± 4,26	91,63 ± 4,38	86,18 ± 5,02	91,78 ± 3,81	86,38 ± 5,74	95,10 ± 5,22
	500	66,98 ± 4,99	78,83 ± 4,57	73,04 ± 5,49	80,50 ± 3,86	70,46 ± 5,18	83,2 ± 4,86
	800	52,93 ± 4,34	69,69 ± 5,57	55,69 ± 4,79	70,86 ± 3,69	55,21 ± 4,75	71,96 ± 4,83
	1000	44,03 ± 6,19	56,88 ± 3,54	45,12 ± 6,37	63,78 ± 4,01	42,59 ± 4,17	62,90 ± 3,63
	1500	10,03 ± 3,74	47,99 ± 3,95	21,38 ± 5,22	50,88 ± 4,17	31,79 ± 4,53	51,06 ± 4,79

M3. táblázat. *A. vulneraria*, *F. magellanica*, *F. triphylla* és *L. nummularia* 50%-os etanolos kivonatainak citotoxikus hatása 3T3 és a HaCaT sejtekre intracelluláris ATP-tartalom, sejtszám (PI), valamint összes fehérjetartalom meghatározásával. Az adatokat a kontroll minták %-ában fejeztük ki.

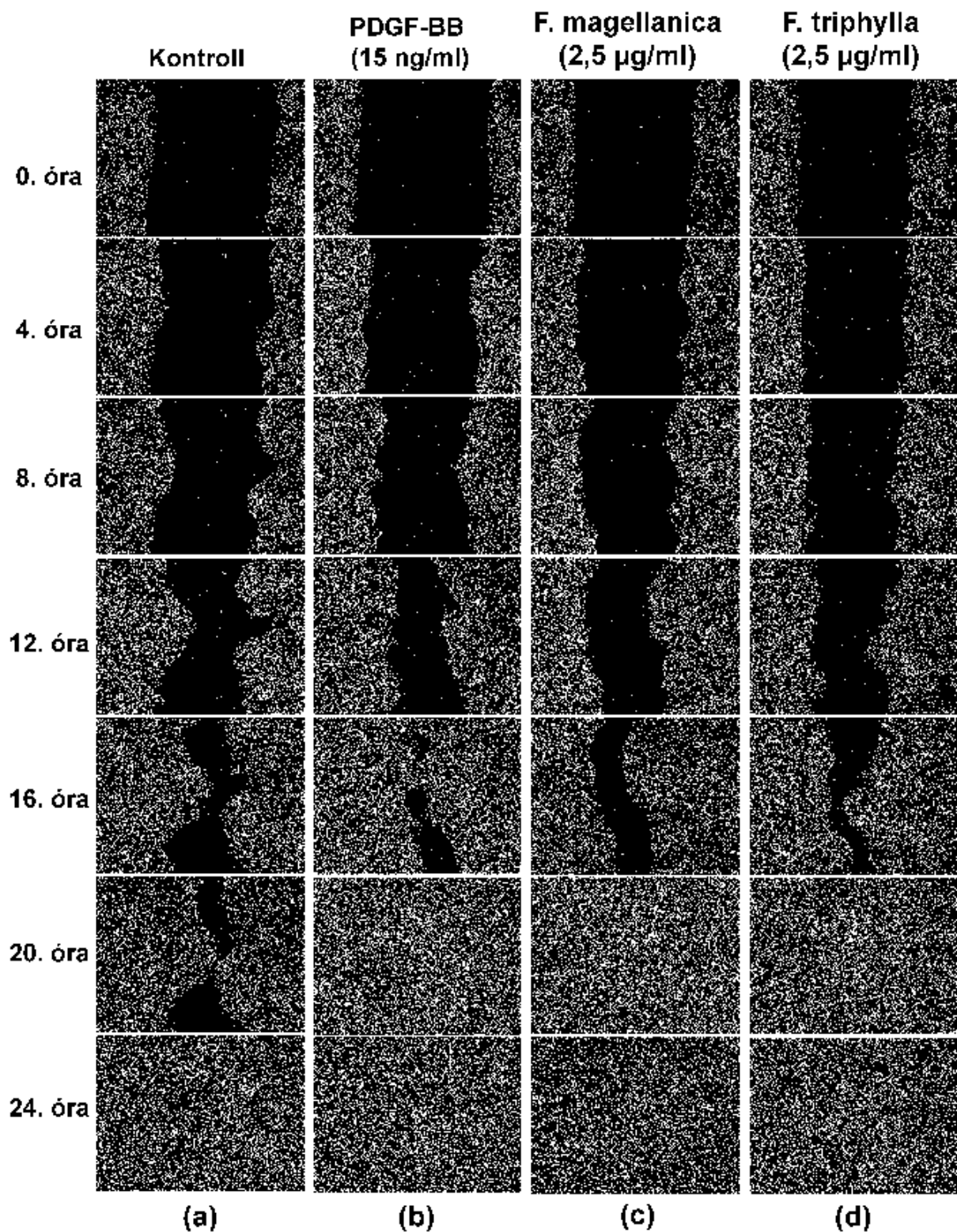
Életképesség (%) ± szórás							
	Koncentráció (µg/ml)	ATP		Nukleinsav		Fehérje	
		3T3	HaCaT	3T3	HaCaT	3T3	HaCaT
Kontroll	0	100 ± 3,94	100,00 ± 2,96	100,00 ± 4,63	100,00 ± 4,32	100,00 ± 3,15	100,00 ± 3,79
<i>A. vulnararia</i>	4000	92,24 ± 6,38	91,95 ± 4,64	98,25 ± 7,98	95,00 ± 4,55	95,08 ± 7,41	93,84 ± 5,46
	5000	81,00 ± 6,79	76,86 ± 4,04	85,13 ± 8,13	81,63 ± 7,22	84,65 ± 7,81	78,31 ± 5,28
	6000	45,12 ± 9,43	62,85 ± 4,31	64,37 ± 9,83	65,60 ± 4,73	63,23 ± 7,37	63,26 ± 4,47
	7000	21,62 ± 4,57	42,21 ± 2,82	45,50 ± 5,17	50,32 ± 1,88	43,62 ± 5,33	49,56 ± 5,73
	8000	7,38 ± 3,26	31,82 ± 3,08	32,23 ± 4,44	41,06 ± 3,23	34,58 ± 6,18	39,18 ± 5,38
<i>F. magellanica</i>	120	93,51 ± 6,34	95,02 ± 5,91	92,47 ± 6,82	94,32 ± 3,82	89,90 ± 4,14	95,86 ± 5,30
	250	85,33 ± 5,53	83,15 ± 3,62	82,27 ± 5,87	84,50 ± 4,75	80,38 ± 5,26	84,86 ± 5,67
	500	73,94 ± 5,63	67,04 ± 4,98	70,90 ± 5,40	72,52 ± 4,59	69,05 ± 5,91	74,86 ± 4,30
	800	29,88 ± 5,89	52,07 ± 4,39	50,84 ± 3,24	61,16 ± 4,70	52,32 ± 2,81	62,66 ± 4,64
	1000	13,87 ± 3,93	40,16 ± 5,51	35,33 ± 3,10	46,90 ± 4,44	41,27 ± 3,56	52,54 ± 2,44
<i>F. triphylla</i>	120	87,33 ± 4,76	94,50 ± 5,61	90,94 ± 3,86	95,13 ± 4,13	92,69 ± 4,94	94,67 ± 4,65
	250	76,70 ± 4,42	82,29 ± 4,41	83,63 ± 4,06	86,10 ± 3,52	80,87 ± 4,73	88,72 ± 5,87
	500	66,92 ± 4,87	73,27 ± 2,95	72,96 ± 6,01	78,26 ± 4,71	66,44 ± 4,29	81,01 ± 5,12
	800	38,55 ± 6,87	52,09 ± 4,74	61,28 ± 4,48	67,99 ± 4,66	48,26 ± 4,58	69,44 ± 4,62
	1000	17,88 ± 1,97	37,53 ± 5,27	44,47 ± 4,18	48,38 ± 3,64	26,15 ± 3,94	52,00 ± 4,55
<i>L. nummularia</i>	3000	84,74 ± 4,17	96,79 ± 5,11	83,64 ± 5,77	95,26 ± 5,61	87,98 ± 4,50	95,38 ± 4,55
	4000	78,22 ± 3,85	88,95 ± 5,07	73,10 ± 6,16	89,76 ± 4,36	79,07 ± 4,93	90,78 ± 5,75
	5000	69,63 ± 3,49	78,00 ± 4,74	61,83 ± 3,40	77,37 ± 4,23	67,68 ± 5,86	80,98 ± 4,53
	6000	60,18 ± 4,98	68,58 ± 6,86	55,81 ± 4,31	68,46 ± 4,44	57,59 ± 3,45	72,17 ± 5,41
	7000	51,35 ± 4,34	53,95 ± 4,63	48,98 ± 5,15	60,30 ± 4,20	44,66 ± 3,74	59,30 ± 7,28

M4. táblázat. *A. vulnararia*, *F. magellanica*, *F. triphylla* és *L. nummularia* vizes kivonatainak citotoxikus hatása 3T3 és a HaCaT sejtekre intracelluláris ATP-tartalom, sejtszám (PI), valamint összes fehérjetartalom meghatározásával. Az adatokat a kontroll minták %-ában fejeztük

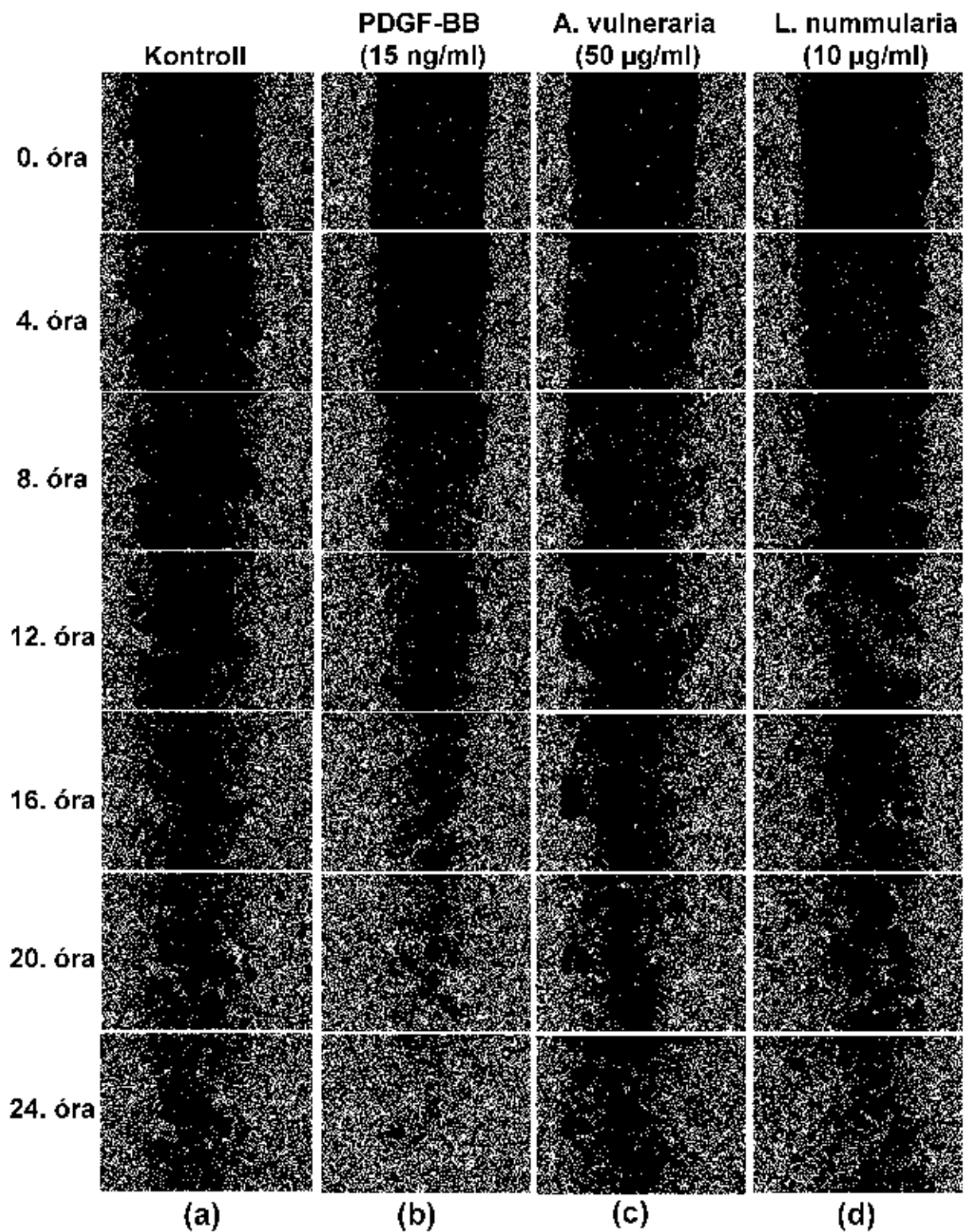
ki.



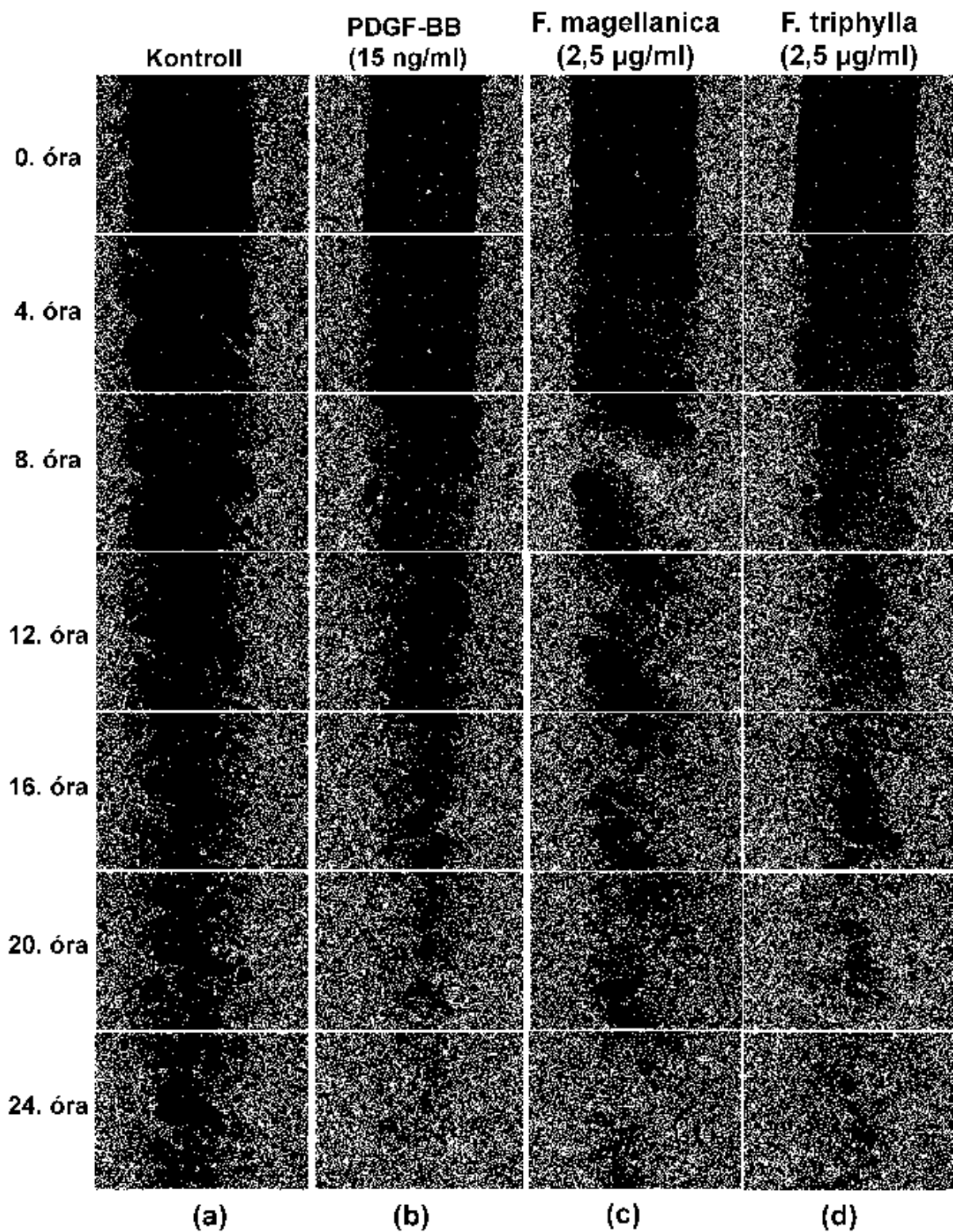
M12. ábra. Kezeletlen kontroll (a), PDGF (b), *A. vulneraria* (c) és *L. nummularia* (d) 50%-os (v/v) etanolos kivonatainak time-lapse alapú összehasonlító képalkotó elemzése 24 órán keresztül 4 óránkénti fotó készítésével *HaCaT* monolayer tenyészetek „sebzáródási” képességére fáziskontraszt mikroszkóppal



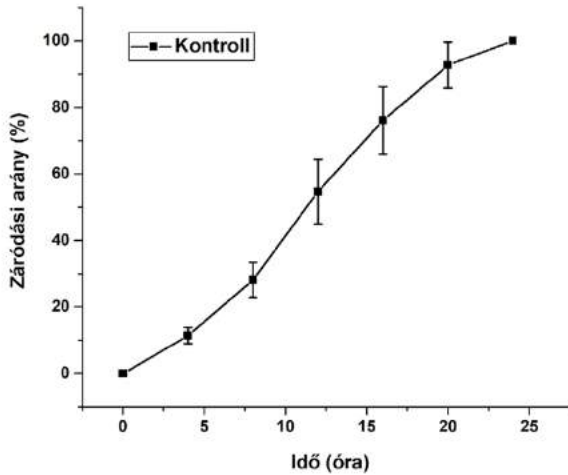
M13. ábra. Kezeletlen kontroll (a), PDGF (b), *F. magellanica* (c) és *F. triphylla* (d) 50%-os (v/v) etanolos kivonatainak time-lapse alapú összehasonlító képalkotó elemzése 24 órán keresztül 4 óránkénti fotó készítésével HaCaT monolayer tenyészetek „sebzáródási” képességére fáziskontraszt mikroszkóppal



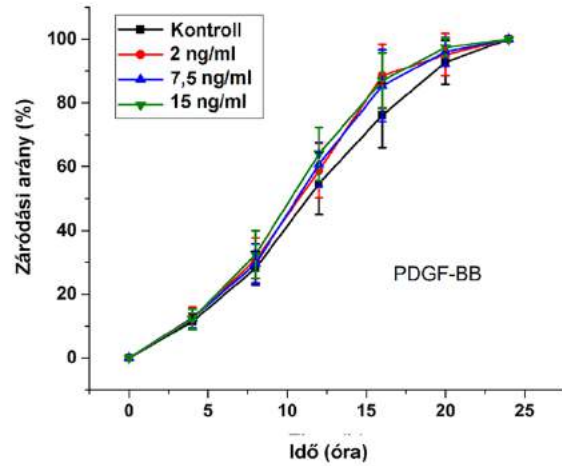
M14. ábra. Kezeletlen kontroll (a), PDGF (b), *A. vulneraria* (c) és *L. nummularia* (d) 50%-os (v/v) etanolos kivonatainak time-lapse alapú összehasonlító képalkotó elemzése 24 órán keresztül 4 óránkénti fotó készítésével 3T3 monolayer tenyészetek „szbáródási” képességére fáziskontraszt mikroszkóppal



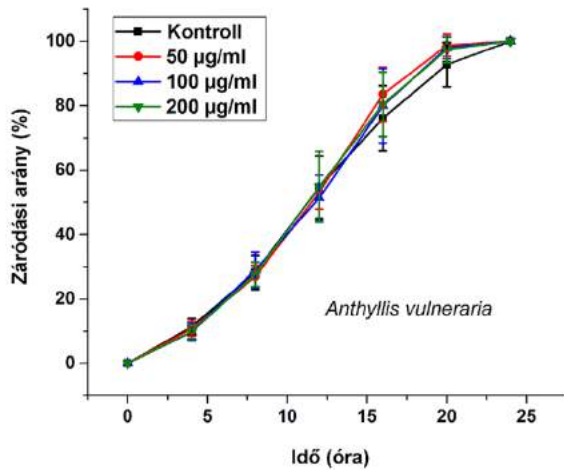
M15. ábra. Kezeletlen kontroll (a), PDGF (b), *F. magellanica* (c) és *F. triphylla* (d) 50%-os (v/v) etanolos kivonatainak time-lapse alapú összehasonlító képalkotó elemzése 24 órán keresztül 4 óránkénti fotó készítésével 3T3 monolayer tenyészetek „sebzáródási” képességére fáziskontraszt mikroszkóppal



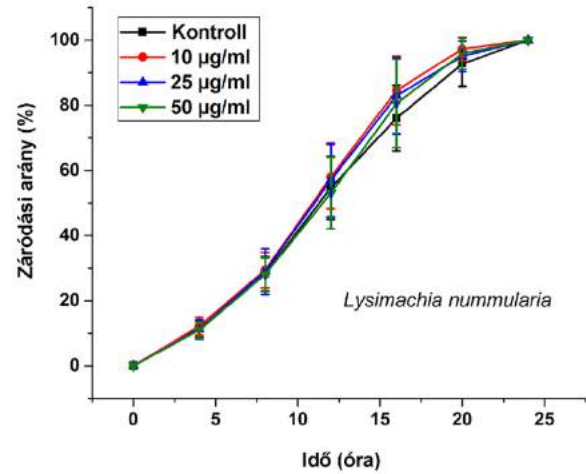
(a)



(b)

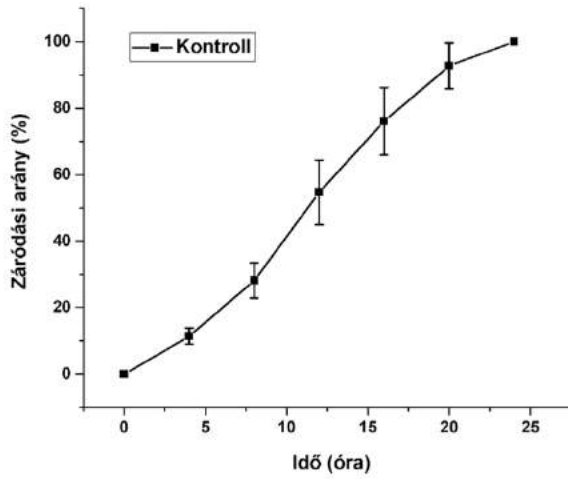


(c)

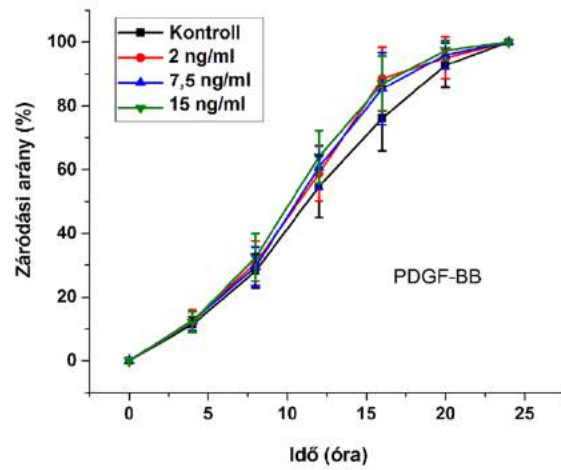


(d)

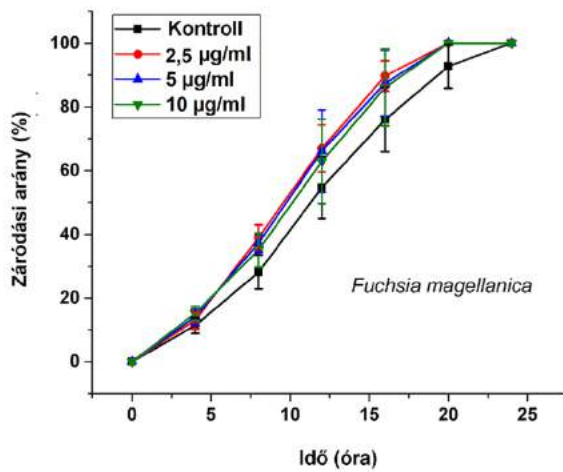
M16. ábra. Kezeletlen kontroll (a), PDGF (b), *A. vulneraria* (c) és *L. nummularia* (d) 50%-os (v/v) etanolos kivonatainak 3 különböző koncentrációjával összesített záródási görbéi 24 órán keresztül 4 óránkénti fotó elemzésével a HaCaT monolayer tenyészetek „sebzáródási” képességére. A sejtmentes terület záródási arányát (%-ban) pixel intenzitásban határoztuk meg, amiből a továbbiakban görbe alatti területet (AUC) számoltunk



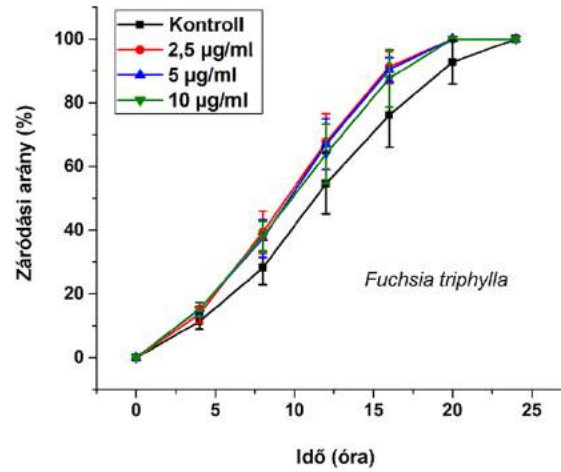
(a)



(b)

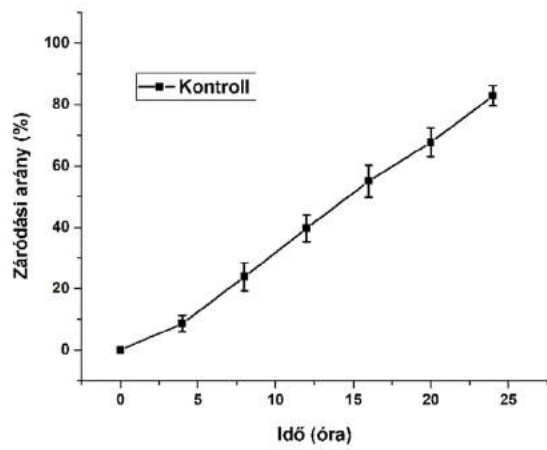


(c)

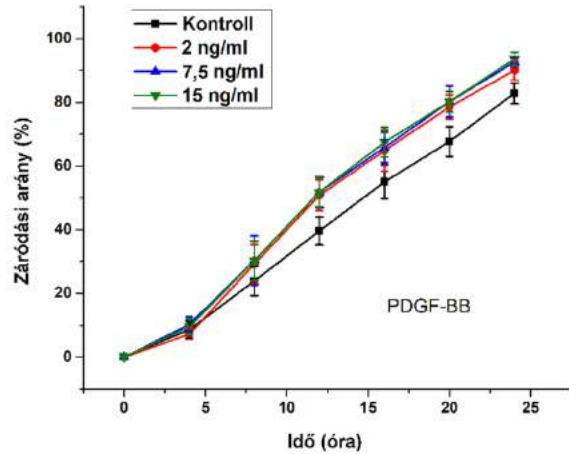


(d)

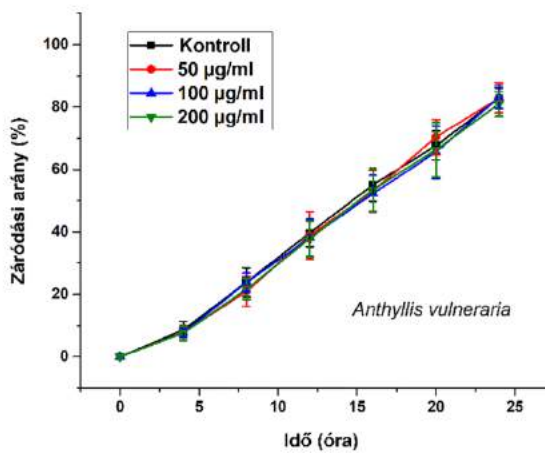
M17. ábra. Kezeletlen kontroll (a), PDGF (b), *F. magellanica* (c) és *F. triphylla* (d) 50%-os (v/v) etanolos kivonatainak 3 különböző koncentrációjával összesített záródási görbéi 24 órán keresztül 4 óránkénti fotó elemzésével a HaCaT monolayer tenyészetek „sebzáródási” képességére. A sejtmentes terület záródási arányát (%-ban) pixel intenzitásban határoztuk meg, amiből a továbbiakban görbe alatti területet (AUC) számoltunk



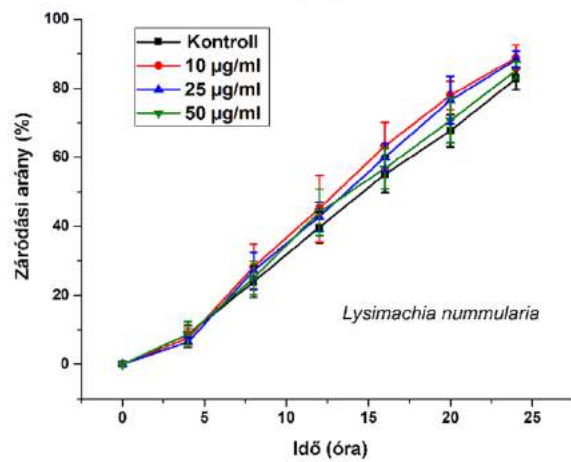
(a)



(b)

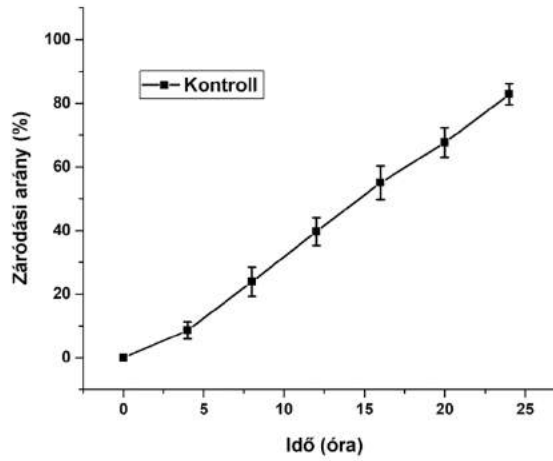


(c)

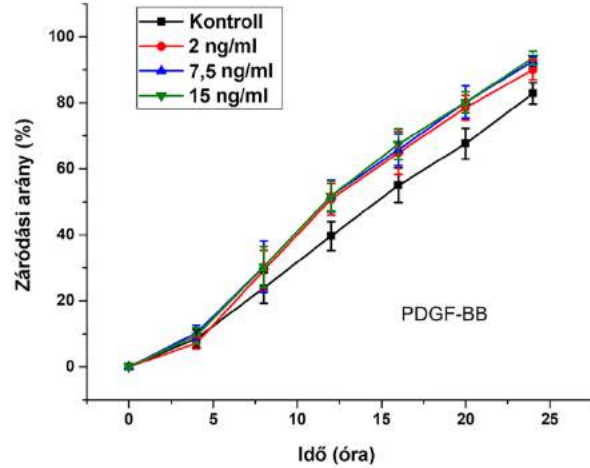


(d)

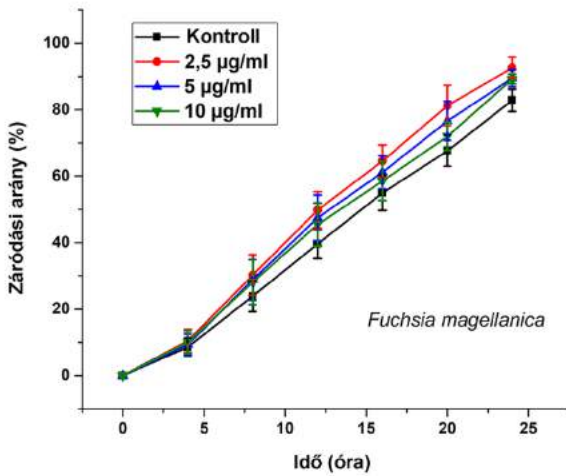
M18. ábra. Kezeletlen kontroll (a), PDGF (b), *A. vulneraria* (c) és *L. nummularia* (d) 50%-os (v/v) etanolos kivonatainak 3 különböző koncentrációjával összesített záródási görbéi 24 órán keresztül 4 óránkénti fotó elemzésével a 3T3 monolayer tenyészetek „sebzáródási” képességére. A sejtmentes terület záródási arányát (%-ban) pixel intenzitásban határoztuk meg, amiből a továbbiakban görbe alatti területet (AUC) számoltunk



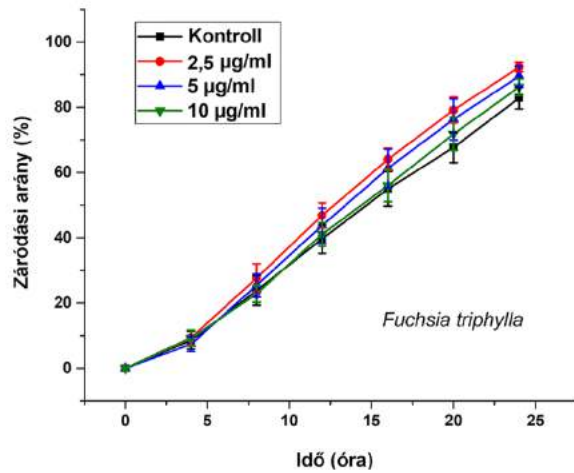
(a)



(b)



(c)



(d)

M19. ábra. Kezeletlen kontroll (a), PDGF (b), *F. magellanica* (c) és *F. triphylla* (d) 50%-os (v/v) etanolos kivonatainak 3 különböző koncentrációjával összesített záródási görbéi 24 órán keresztül 4 óránkénti fotó elemzésével a 3T3 monolayer tenyészetek „sebzáródási” képességére. A sejtmentes terület záródási arányát (%-ban) pixel intenzitásban határoztuk meg, amiből a továbbiakban görbe alatti területet (AUC) számoltunk

Article

Complex Formation of Resorufin and Resazurin with β -Cyclodextrins: Can Cyclodextrins Interfere with a Resazurin Cell Viability Assay?

Rita Csepregi ^{1,2}, Beáta Lemli ^{2,3,4}, Sándor Kunsági-Máté ^{2,3,4}, Lajos Szente ⁵, Tamás Kőszegi ^{1,2}, Balázs Németi ⁶ and Miklós Poór ^{2,6,*}

¹ Department of Laboratory Medicine, University of Pécs, Medical School, Pécs H-7624, Hungary; ritacsepregi93@gmail.com (R.C.); korszegi.tamas@pte.hu (T.K.)

² János Szentágothai Research Center, University of Pécs, Pécs H-7624, Hungary; lemli.beata@gytk.pte.hu (B.L.); kunsagi-mate.sandor@gytk.pte.hu (S.K.)

³ Department of General and Physical Chemistry, University of Pécs, Pécs H-7624, Hungary

⁴ Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Pécs, Faculty of Pharmacy, Pécs H-7624, Hungary

⁵ CycloLab Cyclodextrin Research & Development Laboratory, Ltd., Budapest H-1097, Hungary; szente@cyclolab.hu

⁶ Department of Pharmacology, University of Pécs, Faculty of Pharmacy, Pécs H-7624, Hungary; balazs.nemeti@aok.pte.hu

* Correspondence: poor.miklos@pte.hu; Tel.: +36-72-536-000 (ext. 31646)

Received: 8 January 2018; Accepted: 8 February 2018; Published: 10 February 2018

Abstract: Resazurin (or Alamar Blue) is a poorly fluorescent dye. During the cellular reduction of resazurin, its highly fluorescent product resorufin is formed. Resazurin assay is a commonly applied method to investigate viability of bacterial and mammalian cells. In this study, the interaction of resazurin and resorufin with β -cyclodextrins was investigated employing spectroscopic and molecular modeling studies. Furthermore, the influence of β -cyclodextrins on resazurin-based cell viability assay was also tested. Both resazurin and resorufin form stable complexes with the examined β -cyclodextrins ($2.0\text{--}3.1 \times 10^3$ and $1.3\text{--}1.8 \times 10^3$ L/mol were determined as binding constants, respectively). Cells were incubated for 30 and 120 min and treated with resazurin and/or β -cyclodextrins. Our results suggest that cyclodextrins are able to interfere with the resazurin-based cell viability assay that presumably results from the following mechanisms: (1) inhibition of the cellular uptake of resazurin and (2) enhancement of the fluorescence signal of the formed resorufin.

Keywords: resazurin; resorufin; cyclodextrin; host-guest interaction; Alamar Blue; cell viability assay

1. Introduction

Resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) also called Alamar Blue is a dye commonly used for measurements assaying cell viability [1–3]. Resazurin itself is weakly fluorescent; however, its reduction by bacteria or mammalian cells results in a pink and highly fluorescent derivative resorufin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one) that is formed (Figure 1) [4]. Resorufin in turn can be reduced further into the colorless and non-fluorescent hydroresorufin [5]. The resazurin assay is applied commonly to investigate antibiotic resistance of some bacteria (e.g., *Mycobacterium* strains), to test the antibacterial action of various compounds, or even to examine bacterial biofilm formation [6–8]. On comparing with other assays testing cell viability, the resazurin-based assay appears suitable and reliable for investigating the toxic effect of various compounds on mammalian cells [2,9,10]. Based on previous studies, there is a direct correlation between the reduction of resazurin and the number/proliferation of bacteria or mammalian cells [5]. The resazurin or Alamar Blue assay is used commonly for testing cell viability because its cost is low, and we do not need to extract the cells, owing

to the much lower cytotoxicity of resazurin and its derivatives than of the reagents employed in other assays, including the commonly applied MTT assay [5]. Resazurin assay itself is a simple and rapid method to test cell viability. Resazurin solution is added to the cells in a volume corresponding to 10% of the medium (without replacing the medium), and then the conversion to resorufin can be measured by either colorimetry or fluorimetry. Nevertheless, fluorimetry appears more sensitive compared to the colorimetric analysis [5]. The fluorescence excitation and emission maxima of resorufin are approximately at 570 nm and 585 nm, respectively [11]. However, during the resazurin-based viability assay, the fluorescence of the formed resorufin is determined in the samples using 530 to 580 nm as excitation and 570 to 620 nm as emission wavelengths [3,10,12].

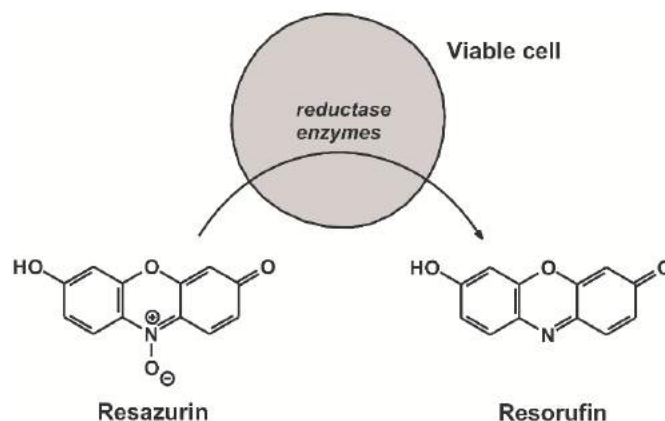


Figure 1. Chemical structures of resazurin and resorufin. Reductases of viable cells reduce resazurin resulting in the formation of its highly fluorescent metabolic product resorufin.

Cyclodextrins (CDs) are intensively studied host molecules that are widely applied by analytical chemistry as well as food, cosmetic, and pharmaceutical industries [13–16]. The usually employed CDs are α -, β -, and γ -cyclodextrins, which are built up from six, seven, or eight glucopyranose units, respectively [17,18]. CDs possess a ring-shaped, conical structure with a hydrophobic interior and a hydrophilic exterior spaces, which makes their internal cavity able to accommodate relatively lipophilic molecules or structural moieties. The stability of the formed host-guest type complexes as well as the selectivity of CDs towards the guest molecules are usually highly influenced by chemical modifications of the basic CD structures [18,19].

Based on previous investigations, resazurin forms a stable complex with γ -CD [20], and resorufin interacts with native β - and γ -cyclodextrins [21–23]. CDs are able to influence the cellular uptake of the guest molecules [24]; furthermore, CD-complexes of fluorophore molecules commonly exhibit stronger fluorescence than the fluorophore alone [25,26]. A recent study reported that the presence of CDs can interfere with bioluminescence imaging due to complex formation with D-luciferin [27]. Therefore, CDs may also be able to disturb the measurement of other fluorescent dye molecules, including resorufin. CDs can occur in several *in vitro* experiments carried out on cells where the resazurin-based assay is applied to test cell viability [28–30]. The basic protocol of the resazurin assay applies addition of 10% volume of resazurin solution to the cell medium without the replacement of the medium. This, however, may result in the interaction of CDs with resazurin and/or the formed resorufin. Even if many researchers replace the cell media (and thus the CDs present) before resazurin assay, methylated CDs can be taken up by cells through fluid-phase endocytosis [31], resulting in the possible formation of resazurin-CD and resorufin-CD complexes intracellularly.

In this study, the complex formation of resorufin and the parent compound resazurin with β -cyclodextrin (BCD), hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD), and heptakis-2,6-di-*O*-methyl- β -cyclodextrin (DIMEB) was investigated employing fluorescence and UV-Vis spectroscopy. The fluorescence enhancement of resorufin by CDs as well as the stability of the formed resorufin-CD

complexes were determined, and the interaction was investigated further by molecular modeling studies. Then resazurin-CD and resorufin-CD complex formations were examined employing UV-Vis spectroscopy. Because our spectroscopic studies suggested the strong fluorescence enhancement of resorufin by CDs as well as the formation of stable dye-CD complexes, the effect of CDs on resazurin-based cell viability assay was also tested. As the results demonstrate, some of the CDs are able to interfere with resazurin assay. Therefore, it should also be taken into account that when assaying cell viability, CDs present in the medium could potentially confound the data obtained.

2. Results and Discussion

2.1. Fluorescence Spectroscopic Investigation of Resorufin-CD Interactions

First, the concentration dependent effect of CDs on the fluorescence signal of resorufin was examined at 25 °C. Therefore, increasing concentrations of BCD, HPBCD, and DIMEB (0–1200 μM) were added to a fixed concentration of resorufin (0.4 μM) in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Fluorescence emission spectra were recorded using 570 nm as excitation wavelength (this wavelength proved the excitation maximum of resorufin; see in Figure S1). As Figure 2 demonstrates, the fluorescence signal of resorufin increased in the presence of each CD in a concentration dependent fashion. The strongest fluorescence enhancement of resorufin was observed with DIMEB, while in the presence of BCD and HPBCD, the fluorescence enhancement was weaker. Furthermore, a red shift of the emission maximum of resorufin was observed in the presence of each of the three CDs (HPBCD > DIMEB > BCD). Under the applied conditions, CDs alone did not express any fluorescence signal; therefore, it is reasonable to hypothesize that the fluorescence enhancement of resorufin by CDs is ascribable to the host-guest type complex formation of the examined compounds. The microenvironment within the cyclodextrin cavity is less polar than in water; its dielectric properties are close to those of 70% *v/v* ethanol-water mixture. The fluorescence signal of a fluorophore is strongly influenced by polarity of the environment around the molecule. In the CD nanocavity, the fluorophore is surrounded by apolar microenvironment, thus affecting its fluorescence due to the molecule being entrapped by the CD. Based on these principles, complex formation of a fluorophore with a CD is commonly associated with the increase of its fluorescence signal [25,26]. Furthermore, the methylation of BCD has two consequences: (1) the cavity depth is extended in both primary and secondary side of the cylinder, which becomes taller, while cavity diameter is unchanged and (2) self-assembly-related poor aqueous solubility of parent BCD is dramatically improved by methylation (intermolecular H-bond formation is disrupted by methyl groups).

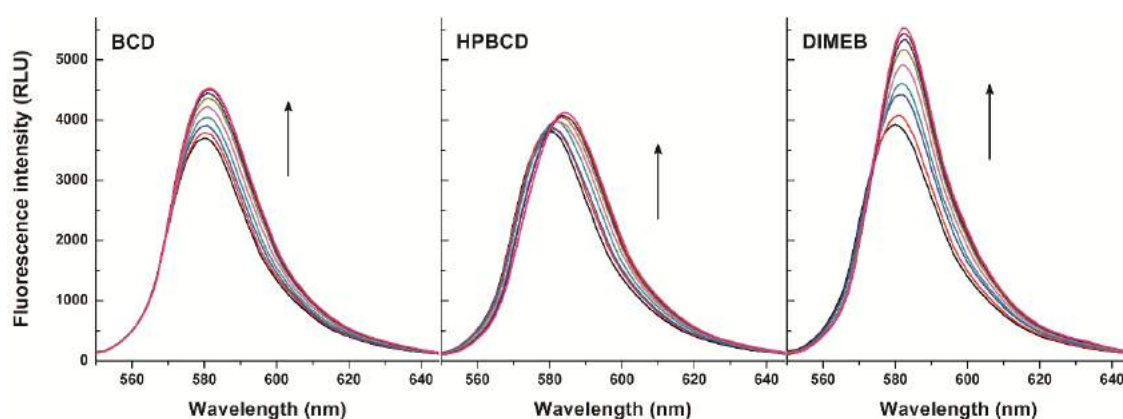


Figure 2. Fluorescence emission spectrum of resorufin (0.4 μM) in the presence of cyclodextrins (CDs) added at concentrations 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, and 1200 μM in PBS (pH 7.4; λ_{ex} = 570 nm) (RLU = relative light unit).

Enhancement of the fluorescence emission intensity of resorufin was evaluated at three emission wavelengths (580, 585, and 590 nm). As Table 1 demonstrates, in the presence of 0.4 μM resorufin and 1200 μM of CDs 22–38%, 1–39%, and 37–53% increases of the fluorescence signal of resorufin were noticed as a result of the complex formations with BCD, HPBCD, and DIMEB, respectively. These observations suggest that during resazurin-based cell viability assays CDs can interact with the formed resorufin. This complex formation, however, leads to a significant increase of the fluorescence signal. Considering the fluorescence enhancement of resorufin by CDs, the resorufin-CD interaction can most likely confound the results of the resazurin-based cell viability assay. This phenomenon may be the most prominent with DIMEB because, being a methylated CD molecule, cells take it up by fluid-phase endocytosis [31]. Moreover, as demonstrated in Table 1, DIMEB induced the strongest fluorescence enhancement of resorufin at each tested emission wavelengths, complicating the evaluation of data even further. With respect to the other CDs tested, they have not been reported to cross the cell membrane, likely limiting their presence to the cell medium.

Table 1. Fluorescence enhancement (I/I_0) of resorufin (0.4 μM) in the presence of cyclodextrins (CDs) (1200 μM each) at different emission wavelengths ($\lambda_{\text{ex}} = 570 \text{ nm}$), and decimal logarithmic values of the binding constants (K ; with the unit of L/mol) of resorufin-CD complexes at 25 and at 37 $^\circ\text{C}$ calculated from the fluorescent spectroscopic studies ($\lambda_{\text{ex}} = 570 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 583 \text{ nm}$; mean \pm SD in 3 separate determinations).

	I/I_0 (580 nm)	I/I_0 (585 nm)	I/I_0 (590 nm)	$\log K$ (25 $^\circ\text{C}$)	$\log K$ (37 $^\circ\text{C}$)
BCD	1.22 (± 0.02)	1.30 (± 0.02)	1.38 (± 0.02)	3.31 (± 0.08)	3.09 (± 0.03)
HPBCD	1.01 (± 0.01)	1.20 (± 0.01)	1.39 (± 0.02)	3.37 (± 0.05)	3.26 (± 0.05)
DIMEB	1.37 (± 0.04)	1.52 (± 0.04)	1.53 (± 0.03)	3.59 (± 0.04)	3.52 (± 0.05)

The fluorescence of the resorufin-CD complexes was significantly stronger than that of the dye molecule in its free form. Based on the enhanced fluorescence of resorufin in the presence of increasing CD concentrations (Figure 3, left), the binding constants of the formed complexes were calculated employing the graphical application of the Benesi-Hildebrand Equation (Equation (1)). Benesi-Hildebrand plots of resorufin-CD complexes were linear and correlated with the 1:1 stoichiometry model well (Figure 3, right). The calculated binding constants of the tested resorufin-CD complexes indicated similar stability values; however, HPBCD and DIMEB formed more stable complexes with resorufin compared to the native BCD molecule (Table 1). Our results are in good agreement with the previously published data of Balabai et al. [21], where similar $\log K$ value of resorufin-BCD complex ($\log K = 3.3$) and 1:1 stoichiometry of complex formation were reported.

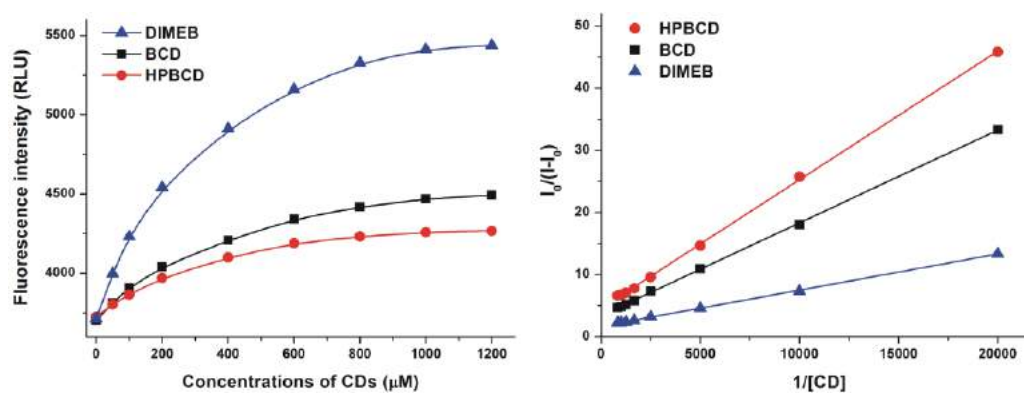


Figure 3. Fluorescence emission intensities (left) of resorufin (0.4 μM) in the presence of increasing β -cyclodextrin (BCD), hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD), and heptakis-2,6-di-*O*-methyl- β -cyclodextrin (DIMEB) concentrations in PBS (pH 7.4; left). Benesi-Hildebrand plots of resorufin-CD complexes (right; $\lambda_{\text{ex}} = 570 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 583 \text{ nm}$) (RLU = relative light unit).

Because the incubation of cells with resazurin during the viability assay is carried out at 37 °C, resorufin-CD complex formations were investigated at 37 °C as well. The stability of the complexes was lower at 37 °C than at 25 °C, irrespective of the CD tested. The stability of the resorufin-DIMEB complex weakened minimally, whereas the stability of the resorufin complexes with the other two CDs exhibited a more pronounced, although still slight, reduction (Table 1). These findings indicate that we can count on similar stability of the resorufin-CD complexes at 37 °C as at 25 °C.

2.2. Molecular Modeling of Resorufin-CD Interactions

Host-guest interactions are known to be associated with the loss of solvent shell of guest molecules and host's cavity becoming empty prior to the molecular association. Since the experimental results alone cannot confirm the dehydration of the guest molecules, both situations (hydrated or dehydrated guest) were considered during molecular modeling. Accordingly, three series of calculations were performed: (1) the dehydration was ignored during the determination of the enthalpy and entropy changes of the molecular interactions; (2) the dehydration of the guest molecules was considered and calculated by the TIP3P model; and (3) both the dehydration and the energy cost associated to the exit of water molecules from BCD and DIMEB cavities prior the interaction with the resorufin molecules were considered (Table 2).

Table 2. Thermodynamic parameters of resorufin-BCD and resorufin-DIMEB complexes, ignoring the dehydration of guest molecules prior to the interaction (top), considering the outer dehydration of the guest molecules prior to the interaction (middle), or considering both the dehydration of the guest molecules and dehydration of the host's cavity prior to the interaction (bottom).

Without dehydration prior to the interaction			
	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/K·mol)	$\Delta G_{298\text{ K}}$ (kJ/mol)
resorufin-BCD	−39.3	3.0	−40.2
resorufin-DIMEB	−50.5	1.9	−51.1
With dehydration of the guest prior to the interaction			
	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/K·mol)	$\Delta G_{298\text{ K}}$ (kJ/mol)
resorufin-BCD	−28.4	34.6	−38.8
resorufin-DIMEB	−39.6	33.5	−49.6
With dehydration of the guest and the host's cavity prior to the interaction			
	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/K·mol)	$\Delta G_{298\text{ K}}$ (kJ/mol)
resorufin-BCD ¹	−9.6	35.2	−20.9
resorufin-DIMEB ²	−13.2	34.1	−23.4

¹ Theoretical logK value at room temperature was 3.52 while the experimental value was 3.33. ² Theoretical logK value at room temperature was 4.09 while the experimental value was 3.55.

Very similar Gibbs free energy values were obtained at 298 K in both the hydrated and the dehydrated guest model, clearly showing that the experiments cannot offer information about the hydration state. However, the molecular dynamics simulation are in accordance with the enthalpy-entropy compensation effect associated to the dehydration of the guest: the energy invested to remove the hydration shell of resorufin molecules appears in the entropy gain associated to the molecular interaction. The negative Gibbs free energy changes validated the presence of stable resorufin-BCD and slightly stronger resorufin-DIMEB complexes in the solutions at room temperature. The formation of stable complexes is supported by both the negative enthalpy and the positive entropy terms, independently from the fact whether or not the hydration is considered during the simulations.

The stability values calculated from Gibbs free energy changes (Table 2) are approximately three order of magnitude higher compared to the experimental values. These findings reflect the presence of exchange reactions instead of simple molecular association. To model plausible processes, the

theoretical calculations were extended for the following model: three water molecules located in the cavity of the BCD or DIMEB leave before the resorufin guest enters into the cavity. Calculations show markedly less enthalpy changes for these exchange reactions, while the entropy values do not change significantly, compared to the ΔH and ΔS values associated to the guest dehydration model (Table 2). The reduction of the enthalpy changes can be explained by the breaking of the bonds between the water molecules and the host's cavity, while the unchanged entropy values reflect ordered structure of water molecules both inside and outside the host's cavity. The theoretically calculated stability constants derived from the third model are in good agreement with the experimentally determined data and exhibit the same tendency: the stability of the resorufin-DIMEB complex is higher than that of the resorufin-BCD complex.

In agreement with the well-known enthalpy-entropy compensation effect, the decomposition of the solvation shell of resorufin molecules does not affect the formation of resorufin-BCD or resorufin-DIMEB complexes around room-temperature. The enthalpy-entropy compensation effect is associated to the energy cost of breaking the interaction between the solvent molecules and the solute, during which the solvation shell is dissipated. The entropy gain derived from the increased freedom of solvent molecules becomes released from the solvation shell of the resorufin molecule immediately before the complex formation. On calculation, the protonated and deprotonated forms of resorufin returned the same interaction energy changes (data not shown). This phenomenon is likely due to the inclusion of the benzoquinone-imine moiety, which remains practically unaffected by the presence or absence of the proton of the OH group (Figure 4).

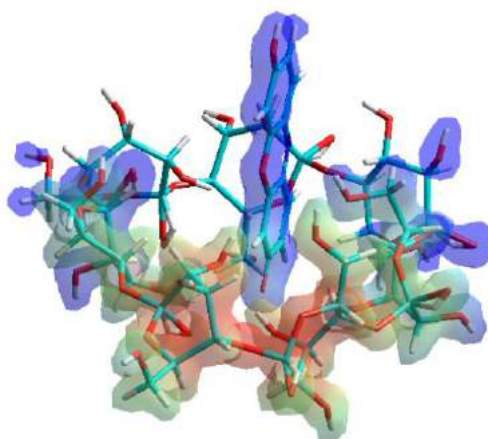


Figure 4. Inclusion complex of the host β -cyclodextrin (BCD) molecule with the resorufin guest. The complex formation is based on the interaction between the benzoquinone-imine moiety of resorufin molecule and the apolar BCD cavity.

2.3. Investigation of Resazurin-CD and Resorufin-CD Interactions with UV-Vis Spectroscopy

To confirm the calculated binding constants of resorufin-CD complexes (determined from the data of fluorescence spectroscopy; see in Section 2.1) as well as to investigate the possible formation and stability of resazurin-CD complexes, absorption spectra of resorufin and the parent compound resazurin were recorded in the presence of CDs at 25 °C. CDs (0–4000 μM) were added to a fixed concentration of resorufin or resazurin (both 4 μM) in PBS. The absorbance values of both resorufin and resazurin increased together with the increasing CD concentrations (Figures 5 and 6, respectively). Importantly, CDs alone (that is, without resazurin and resorufin) did not have any absorbance at the applied concentrations (data not shown), indicating that the abovementioned increase in the absorbance is most likely due to the interaction of resazurin or resorufin with CDs. In addition, not only absorbance increase but also a slight red shift of the absorption maxima was observed (Figures 5 and 6). These findings suggest that resorufin and resazurin are able to form complexes with CDs.

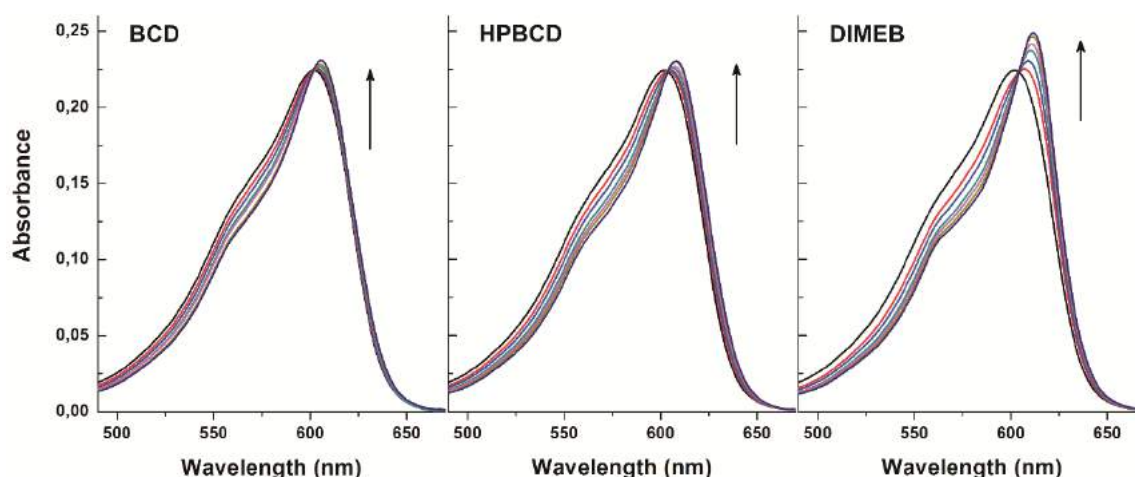


Figure 5. Absorption spectra of resazurin ($4 \mu\text{M}$) in the presence of cyclodextrins (CDs) added at concentrations 0, 250, 500, 1000, 1500, 2500, and $4000 \mu\text{M}$ in PBS (pH 7.4).

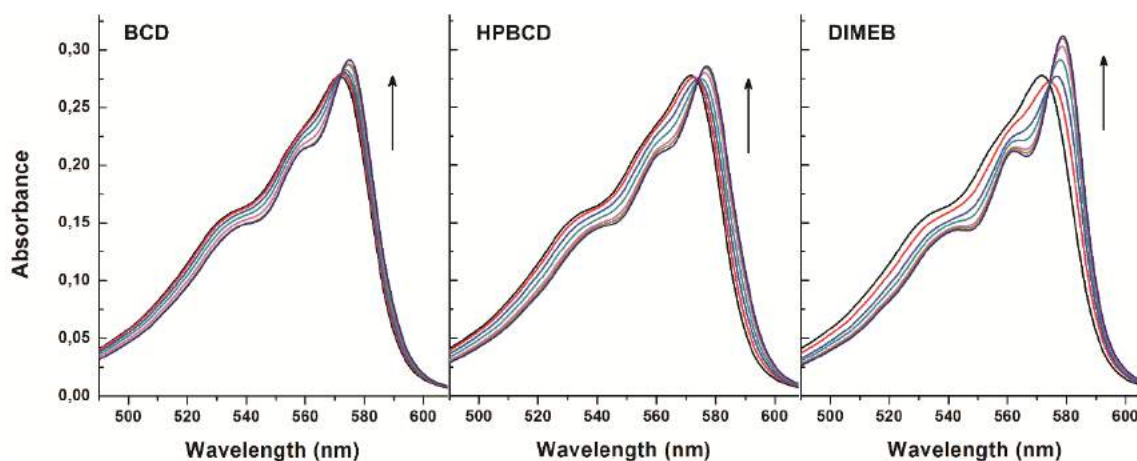


Figure 6. Absorption spectra of resorufin ($4 \mu\text{M}$) in the presence of cyclodextrins (CDs) added at concentrations 0, 100, 250, 500, 1000, 1500, and $2000 \mu\text{M}$ in PBS (pH 7.4).

To support this further, binding constants of the resorufin-CD and resazurin-CD complexes were calculated, employing the graphical application of the Benesi-Hildebrand Equation (Equation (1)). As Figure 7 demonstrates, a linear correlation corresponding to 1:1 stoichiometry of the formed complexes was seen. Binding constants of resorufin-CD complexes (Table 3) were in good agreement with from the findings of the fluorescence spectroscopic studies (Table 1). Furthermore, similar $\log K$ values were calculated for the resazurin-CD than for the resorufin-CD complexes (Table 3), confirming the conclusion that resazurin can indeed form complexes with CDs with similar stability than resorufin. These observations strongly suggest that CDs present in cell media are able to influence the cellular uptake of the resazurin through complex formation. The velocity and the extent of the cellular uptake of resazurin is a crucial part of the viability assay because intracellular reductases convert the parent compound resazurin to the highly fluorescent product resorufin. Therefore, CDs may influence resazurin-based cell viability assay in two separate ways: (1) the modified fluorescence intensity of the intracellularly formed resorufin because of its complex formation with CDs (applies only for DIMEB of the tested CDs that is taken up by cells) and (2) the extracellular complex formation of the parent compound resazurin with CDs may also modify the cellular uptake of resazurin.

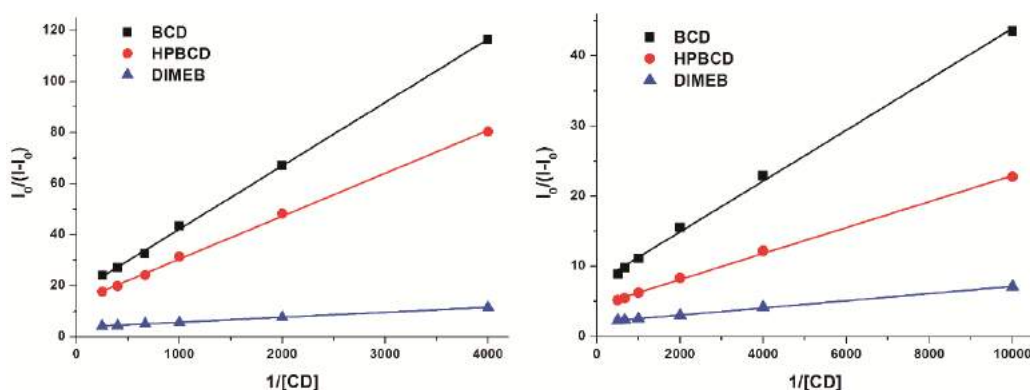


Figure 7. Benesi-Hildebrand plots of resazurin-CD (left; 4 μ M resazurin + 0, 250, 500, 1000, 1500, 2500, and 4000 μ M concentrations of cyclodextrins (CDs)) and resorufin-CD (right; 4 μ M resorufin + 0, 100, 250, 500, 1000, 1500, and 2000 μ M concentrations of CDs) complexes (see wavelengths given in Table 3).

Table 3. Decimal logarithmic values of binding constants (K) of resazurin-CD and resorufin-CD complexes calculated from the changes of absorbance of the dye molecules ($\lambda_{\text{resazurin-BCD}} = 605$ nm, $\lambda_{\text{resazurin-HPBCD}} = 607$ nm, $\lambda_{\text{resazurin-DIMEB}} = 611$ nm, $\lambda_{\text{resorufin-BCD}} = 575$ nm, $\lambda_{\text{resorufin-HPBCD}} = 577$ nm, $\lambda_{\text{resorufin-DIMEB}} = 579$ nm; mean \pm SD in 3 separate determinations).

	Resazurin-CD		Resorufin-CD	
	logK	λ_{max} (nm)	logK	λ_{max} (nm)
BCD	3.13 (\pm 0.02)	605	3.33 (\pm 0.02)	575
HPBCD	3.15 (\pm 0.04)	607	3.36 (\pm 0.03)	577
DIMEB	3.25 (\pm 0.03)	611	3.55 (\pm 0.05)	579

2.4. Effects of CDs on Resazurin-Based Cell Viability Assay, and on ATP and Total Protein Levels of HepG2 Cells

To test the effect of CDs on resazurin-based cell viability assay, cells were treated for 30 or 120 min with 0, 0.25, 0.5, and 1.0 mM CD concentrations in the presence of 2 μ M resazurin (co-treatment). Furthermore, because CDs may be able to influence the viability of HepG2 cells [25], it was also investigated how treatment of cells separately (first with CDs then, following the removal of CDs from the medium, with resazurin) affects cell viability. Figure 8 demonstrates the results of co-treatments and separate incubations after 30 or 120 min. In the 30-min incubations, 0.5 and 1.0 mM BCD and HPBCD concentrations led to significantly lower resorufin signals in the co-treated cells than in cells treated separately (where the CD-containing medium was replaced with CD-free medium before the resazurin assay). Similar effect was observed in the presence of 1.0 mM DIMEB, albeit somewhat weaker (Figure 8, left). Based on our current knowledge, CDs are not able to directly influence the cellular action of a compound; however, the entrapment of a guest molecule inside the CD cavity can inhibit its binding to a target structure (e.g., proteins) or can influence the transport of the guest molecule through the cell membrane. Purportedly, CDs reduce the cellular uptake of resazurin and in turn its intracellular conversion to the highly fluorescent derivative resorufin, because CDs are able to form stable complexes with the parent compound resazurin extracellularly (see in Figure 7 and Table 3), preventing its entry into the cell. This idea is supported by the fact that the cellular uptake (including the gastrointestinal absorption) of drugs whose CD complexes are with relatively low binding constants (logK is typically 2 to 3) is enhanced by CDs [16], while formation of such host-guest complexes with higher binding constants can result in poor cellular uptake of the guest [25]. Thus, the calculated logK values of resazurin-CD complexes (Table 3) may explain the observed effects. DIMEB brought about smaller differences between the co-treated and the separately treated cells in the 30-min incubations. This might originate from the cellular uptake of DIMEB, because its intracellular

presence can, at least partly, alleviate the observed CD effects due to enhancing the fluorescence signal of the intracellularly formed resorufin.

The difference observed in 30-min incubations between co-treated and separately treated cells almost completely disappeared in incubations lasting for 120 min, as only minor differences were observed in the presence of 1.0 mM BCD and 1.0 mM HPBCD concentrations (Figure 8, right). In contrast, DIMEB, instead of weakening the fluorescence seen after 30 min incubation, increased the signal intensity significantly in cells co-treated with resazurin and DIMEB compared to cells treated separately (Figure 8). This phenomenon is likely due to the enhancement of the fluorescence of the intracellularly formed resorufin by DIMEB, because DIMEB belongs to the methylated CDs, which are known to be taken up by cells through endocytosis, whereas other CDs cannot cross the cell membrane [31]. The longer incubation period can readily result in higher amounts of resorufin formed within and higher amount of DIMEB taken up by the cells, leading to increased intracellular resorufin-DIMEB complex formation and stronger fluorescence enhancement. Interestingly, the difference between co-treated and separately treated cells decreased in response to increasing DIMEB concentrations. This phenomenon may also come from the increased cellular uptake of DIMEB during the 120 min incubation period. Even if the medium was replaced before resazurin assay, increasing intracellular DIMEB concentrations can result in three consequences: (1) viability loss of HepG2 cells; (2) increased complex formation with resazurin, thus preventing the reduction of the parent compound; and (3) increased fluorescence signal of resorufin due to the complex formation. Since the loss of cell viability and the intracellular resazurin-DIMEB complex formation counter the increased fluorescence signal of resorufin, this can explain why increased DIMEB concentrations led to weaker enhancement of the resorufin signal.

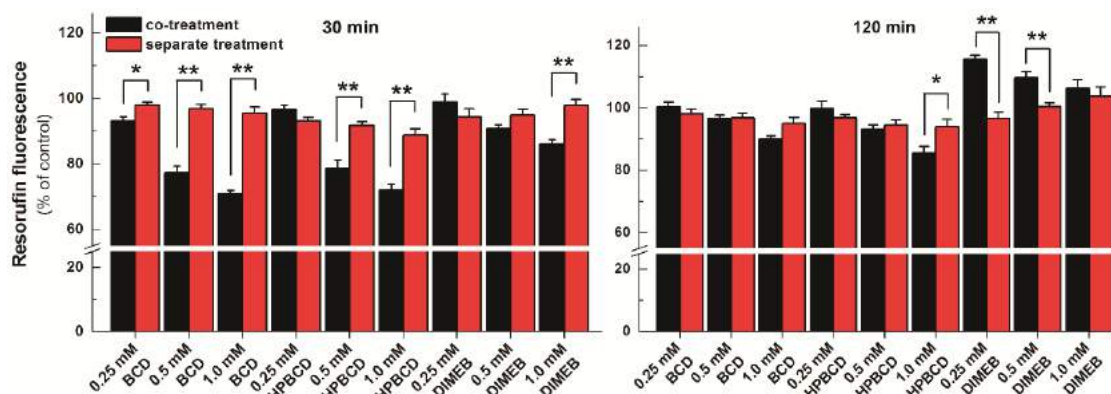


Figure 8. Resazurin-based cell viability assay on HepG2 cells. The cells were incubated with cyclodextrins (CDs) together with resazurin (black bars) or with CDs followed by resazurin (red bars) for 30 min (left) or 120 min (right). Bars represent mean \pm SEM of five independent experiments, based on the measurement of resorufin (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

In order to test this hypothesis, HepG2 cells were incubated for 30 or 120 min with CDs, and then the medium was removed. The thus obtained cell cultures were used for measuring ATP and total protein levels of cells and the results were compared with the data of the resazurin-based assay. Both ATP and total protein levels showed that CD treatments led to a slight loss of viability of HepG2 cells, correlating well with the resazurin assay in cells treated with BCD or HPBCD (Figure 9). In addition, both ATP and total protein levels suggest the loss of cell viability in the presence of DIMEB, even though this CD caused a concentration-dependent increase of the resorufin signal. These results support the idea that despite DIMEB-containing cell medium was removed from HepG2 cells, during the incubations some DIMEB molecules were taken up by cells. Therefore, the intracellular presence of DIMEB may result in the formation of resorufin-DIMEB complexes that can lead to increased

fluorescence signal (even though the cell viability suffers some loss), and consequently yields false data in the resazurin-based cell viability assay.

CDs can enhance the aqueous solubility of lipophilic molecules and/or enhance their cellular uptake; therefore, the biological action of CD complexes with different compounds or the cellular uptake of encapsulated guest molecules are commonly tested in cell experiments [32–34]. Because the stability of these CD complexes are typically low, micromolar concentrations of guest molecules should be accompanied by millimolar CD concentrations for achieving encapsulation of the guest at considerable level. Furthermore, CDs (mainly methylated derivatives) are commonly used for manipulate cellular cholesterol content or for extraction of cholesterol from cell membranes [35–37]. During the above-listed experiments, the effects of the encapsulated test compound and of the applied CD on cell viability need to be tested as well. Since resazurin is a widely used cell viability assay dye, there is a rational chance that researchers choose resazurin to evaluate cell viability.

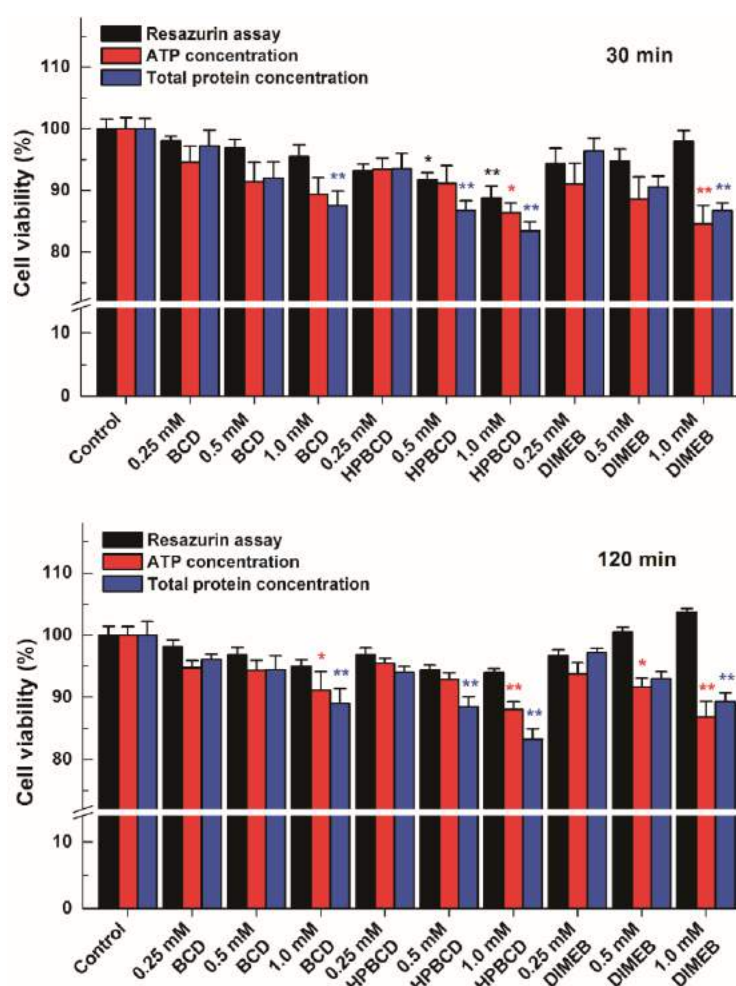


Figure 9. Comparison of the results of the resazurin-based cell viability assay in HepG2 cells treated first with cyclodextrins (CDs) then with resazurin (that is, the CD-containing medium was replaced before addition of resazurin) with the data originating from the changes of intracellular ATP and total protein levels. The cells were incubated for 30 (top) or 120 min (bottom) with CDs (β -cyclodextrin (BCD), hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD), or heptakis-2,6-di-*O*-methyl- β -cyclodextrin (DIMEB)). Bars represent mean \pm SEM of five independent experiments. Asterisks indicate significant difference compared to control incubations with no CD added (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3. Materials and Methods

3.1. Reagents

All reagents were of spectroscopic or analytical grade. Resazurin and resorufin were purchased from Sigma-Aldrich (Waltham, MA, USA). Cyclodextrins, including β -cyclodextrin (BCD), hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD; DS (degree of substitution) = 4.5), and heptakis-2,6-di-*O*-methyl- β -cyclodextrin (DIMEB; DS = 14), were obtained from CycloLab Cyclodextrin Research & Development Laboratory (Budapest, Hungary). 1000 μ M resazurin and 1000 μ M resorufin stock solutions were prepared in dimethyl sulfoxide (Fluka Analytical, spectroscopic grade, Steinheim, Germany) and stored at -20 °C, protected from light. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, Waltham, MA, USA), Fetal Bovine Serum (FBS, Pan-Biotech, Aidenbach, Germany), Bioluminescent ATP Assay Kit CLSII (Roche, Paris, France), bovine serum albumin (BSA; Biosera, Nuaille, France), and Coomassie Brilliant Blue G-250 (Reanal, Budapest, Hungary) were used as received.

3.2. Fluorescence Spectroscopic Measurements

Fluorescence measurements were performed employing a Hitachi F-4500 fluorescence spectrophotometer (Tokyo, Japan). Measurements were carried out at 25 or 37 °C in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). During these studies, increasing CD concentrations were added to standard amount of resorufin (final concentrations: resorufin = 0.4 μ M; CDs = 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, and 1200 μ M), and then fluorescence emission spectra were recorded using 570 nm as excitation wavelength. Binding constants of CD complexes were calculated, using the graphical application of Benesi-Hildebrand equation, assuming 1:1 stoichiometry:

$$\frac{I_0}{(I - I_0)} = \frac{1}{A} + \frac{1}{A * K * [CD]^n} \quad (1)$$

where K is the binding constant (with the unit of L/mol), I_0 and I are fluorescence emission intensities of dye molecules at 583 nm in the absence and presence of CDs, respectively. $[CD]$ is the molar concentration of CDs in the samples, while A is a constant and n is the number of binding sites.

3.3. UV-Vis Spectroscopic Measurements

UV-Vis spectra were recorded using Specord Plus 210 (Analytic Jena AG, Jena, Germany) spectrophotometer. Measurements were carried out at 25 °C in PBS (pH 7.4). During these studies, CDs at concentrations of 0, 250, 500, 1000, 1500, 2500, and 4000 μ M were added to standard resazurin at a concentration of 4 μ M, and then absorption spectra were recorded. The absorption spectra of resorufin (4 μ M) were also measured in the presence of CDs at concentrations of 0, 100, 250, 500, 1000, 1500, and 2000 μ M. Since the complex formation of CDs with resazurin and resorufin results in a slight increase of the absorbance of these dye molecules, binding constants of CD complexes were calculated, employing the graphical application of the Benesi-Hildebrand Equation (Equation (1); see in Section 3.2), where the fluorescence intensity values were replaced with the absorbance values.

3.4. Modeling Studies

Semi-empirical AM1 method was applied to determine the initial structures for molecular dynamics simulations. Regarding DIMEB, the structures used for calculations were generated by replacing hydrogens of two OH groups linked to carbon atoms 2 and 6 of each glucose moieties. Atomic charges of the resorufin molecule and the CDs were calculated using the B3LYP/6-31G(d) method and the basis was set by performing natural population analysis (NPA). Transition states along the reaction path were determined by the HyperChem package (Hypercube, Inc., Gainesville, FL, USA) and the existence of saddle point was validated by the appearance of one virtual vibration frequency.

Molecular dynamics calculations were performed by modeling the interactions at room-temperature. Both the liquid and gas-phase simulations were performed using the MM+ force field implemented in the HyperChem 8.0 program package. The liquid environment was considered by the TIP3P model. In order to find an appropriate initial condition for the dynamics calculations, a “heating” algorithm implemented in HyperChem was used. This procedure heats the molecular system smoothly from lower temperatures to the temperature T , at which the molecular dynamics simulation is performed. The starting geometry for this heating phase is a static initial structure. We used the optimized AM1 geometry of the molecules interacted as initial structures, and the temperature step and the time step in the heating phase were set to 2 K and 0.1 fs, respectively.

Considering the dominance of molecular vibrations in the entropy term associated to the molecular motions, the change of molecular vibrations during the interaction of resorufin and CD molecules was considered to determine the entropy change associated to the complex formation between the resorufin and CD molecules [38,39]. The overall effect of vibrations on the entropy changes and the vibrational entropy contents of each species were calculated applying the Boltzmann-statistics. Accordingly, the frequencies were calculated in the harmonic approximation, and the entropy was calculated on the common way using HyperChem code (Equation (2)):

$$S_{vib} = R \sum_i \left\{ \frac{hv_i/kT}{e^{(hv_i/kT)} - 1} - \ln[1 - e^{(-hv_i/kT)}] \right\} \quad (2)$$

where ν_i is the frequency of vibration, T is the temperature (here equals to 298.16 K). Considering the known limitation of the procedure above [40], the results are applicable within the temperature range of experiments.

The solvation entropy and enthalpy of resorufin were calculated at semi-empirical AM1 level using TIP3P model implemented in the HyperChem code: entropy content calculated for the gas phase molecule was subtracted from the entropy term of solvated species calculated by the TIP3P model. Similar method was applied for the enthalpy term.

3.5. Cell Culture

Adherent cell culture (HepG2, human liver hepatocellular carcinoma, ATCC: HB-8065, Teddington, UK) was cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL), and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were then trypsinized and plated into 96-well sterile plastic plates (10⁴ cells/well). After reaching 80% confluency, the culture medium was replaced with fresh medium containing one of the appropriate concentrations (0, 0.25 mM, 0.5 mM, and 1.0 mM) of the selected CDs (BCD, HPBCD, or DIMEB). Both pre-treatment of cells with CDs (before the addition of resazurin) and the co-treatment with resazurin and CDs were performed.

3.6. Resazurin-Based Cell Viability Assay

In order to test the influence of CDs on resazurin-based cell viability assay, the medium was replaced with fresh DMEM containing 0, 0.25, 0.5, and 1.0 mM CD concentrations (150 µL medium/well). Immediately after the CD treatment, 15 µL of 22 µM resazurin solution (diluted in DMEM) was added to each well (final concentration of resazurin was 2 µM). Thereafter, cells were incubated for 30 or 120 min at 37 °C in the dark then fluorescence emission of the formed resorufin dye was determined in the samples employing a multimode plate reader (Perkin Elmer EnSpire Multimode reader, Waltham, MA, U.S.) using 560 and 590 nm as excitation and emission wavelengths, respectively.

In order to test the potential viability loss of HepG2 cells resulted from the CD treatment, the experiment described above was repeated with some modifications: (1) Cells were pre-treated with CDs for 30 min then the medium was removed. Thereafter, cells were washed three times with 200 µL PBS then 150 µL fresh DMEM and 15 µL of 22 µM resazurin solution (diluted in DMEM) were added

to each well. After 30 min incubation at 37 °C in the dark, resorufin contents were determined by plate reader. (2) Cells were pre-treated with CDs for 120 min then the medium was removed. Thereafter, cells were washed three times with 200 µL PBS then 150 µL fresh DMEM and 15 µL of 22 µM resazurin solution (diluted in DMEM) were added to each well. After 120 min incubation at 37 °C in the dark, resorufin contents were determined by plate reader.

3.7. Quantitation of Intracellular ATP and Total Protein Levels

To further demonstrate the effects of CDs on the viability of HepG2 cells following 30 or 120 min incubation with CDs (0, 0.25, 0.5, and 1.0 mM), intracellular ATP and total protein levels were quantified employing our previously published method with minor modifications [41]. After CD treatment, cells were washed three times with PBS then 250 µL of 5% perchloric acid (PCA) was added to each well. After 15 min incubation at room temperature, 150 µL of the PCA extracts were transferred into an empty plate and neutralized with 9.13% potassium hydroxide (100 µL/well), during which samples were kept in ice. After sedimentation of the formed potassium perchlorate precipitate, 10 µL of the supernates were pipetted into 100 µL ATP reagent, using a white 96-well optical plate. The luminescent ATP measurement was carried out using a plate reader and applying 0.2 second as measuring time.

Intracellular total protein levels were determined using the Bradford reagent [41]. Relative protein concentrations were determined employing a calibration curve of bovine serum albumin (BSA) concentrations as the basis of the comparison. Before measurement, cells were lysed with 1 mol/L sodium hydroxide solution (15 min at room temperature) then 20 µL lysate was added to 200 µL Bradford reagent. The absorbance of the samples was measured at 595 nm using a plate reader.

3.8. Statistics

Means \pm SEM values are derived from at least three independent measurements. Data were analyzed with Student's t-test and one-way ANOVA using IBM SPSS Statistics software (version 21, Armonk, NY, USA) with $p < 0.05$ or $p < 0.01$ as the level of significance.

4. Conclusions

In summary, the interaction of resazurin and its reduced metabolite resorufin was investigated with native and chemically modified β -cyclodextrins, using fluorescence and UV-Vis spectroscopic, and molecular modeling studies. Each tested CD (BCD, HPBCD, and DIMEB) formed stable complexes with resazurin and resorufin, and the presence CDs led to the fluorescence enhancement of resorufin. These observations give rise to the conclusion that CDs can interfere with resazurin-based cell viability assay. In the present work, the testing of this hypothesis is described, using 30 or 120 min incubation times and cells undergoing co-treatment or separate treatment with resazurin and CDs. Furthermore, the effect of CDs on cell viability was examined also by quantifying intracellular ATP and total protein levels. The results presented suggest that CDs can indeed interfere with the resazurin-based cell viability assay, because CDs are able to affect the cellular uptake of resazurin. Furthermore, DIMEB (likely because of its cellular uptake) can enhance the fluorescence signal of resorufin, despite that the presence of DIMEB at increasing concentrations evokes the loss of viability of HepG2 cells. This study highlights that some CDs are able to return false results in the resazurin assay even if the cell medium is replaced prior to the cell viability assay. Therefore, the application of both CDs and the resazurin-based assay during cell experiments needs to be considered thoroughly.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/2/382/s1>, Figure S1: Fluorescence excitation spectrum of resorufin (0.4 µM) in PBS (pH 7.4) [λ_{em} = 583 nm].

Acknowledgments: The project was supported by University of Pécs in the frame of Pharmaceutical Talent Center program. This work was supported by University of Pécs, Medical School (PTE ÁOK-KA-2015/06 [B.N.] and PTE ÁOK-KA-2016/04 [T.K.]) and by the GINOP-2.3.2-15-2016-00049 grant. B.L. acknowledges the support of the ÚNKP-16-4-III New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities (Hungary). The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

Author Contributions: Miklós Poór and Lajos Szenté conceived and designed the experiments. Rita Csepregi and Miklós Poór performed the fluorescence spectroscopic studies. Beáta Lemli and Balázs Németi carried out UV-Vis studies and evaluated the results of spectroscopic measurements. Sándor Kunsági-Máté performed molecular modeling studies. Rita Csepregi and Tamás Kőszegi carried out cell experiments. Miklós Poór, Sándor Kunsági-Máté, and Rita Csepregi wrote the paper. All authors have read, edited, and approved the final version of the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Coban, A.Y.; Deveci, A.; Sunter, A.T.; Palomino, J.C.; Martin, A. Resazurin microtiter assay for isoniazid, rifampicin, ethambutol and streptomycin resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: Updated meta-analysis. *Int. J. Mycobacteriol.* **2014**, *3*, 230–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Präbst, K.; Engelhardt, H.; Ringgeler, S.; Hübner, H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1601*, 1–17. [[PubMed](#)]
3. Rodríguez-Corrales, J.Á.; Josan, J.S. Resazurin live cell assay: Setup and fine-tuning for reliable cytotoxicity results. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1647*, 207–219. [[PubMed](#)]
4. Bueno, C.; Villegas, M.L.; Bertolotti, S.G.; Previtali, C.M.; Neumann, M.G.; Encinas, M.V. The excited-state interaction of resazurin and resorufin with amines in aqueous solutions. Photophysics and Photochemical Reaction. *J. Photochem. Photobiol.* **2002**, *76*, 385–390. [[CrossRef](#)]
5. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421–5426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Martin, A.; Palomino, J.C.; Portaels, F. Rapid detection of ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by two low-cost colorimetric methods: Resazurin and nitrate reductase assays. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 1612–1616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Aguilar-Ayala, D.A.; Cnockaert, M.; André, E.; Andries, K.; Gonzalez-Y-Merchand, J.A.; Vandamme, P.; Palomino, J.C.; Martin, A. In vitro activity of bedaquiline against rapidly growing nontuberculous mycobacteria. *J. Med. Microbiol.* **2017**, *66*, 1140–1143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Van den Driessche, F.; Rigole, P.; Brackman, G.; Coenye, T. Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. *J. Microbiol. Methods.* **2014**, *98*, 31–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Putnam, K.P.; Bombick, D.W.; Doolittle, D.J. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol. In Vitro* **2002**, *16*, 599–607. [[CrossRef](#)]
10. Emter, R.; Natsch, A. A fast Resazurin-based live viability assay is equivalent to the MTT-test in the KeratinoSens assay. *Toxicol. In Vitro.* **2015**, *29*, 688–693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Kim, M.J.; Pal, S.; Tak, Y.K.; Lee, K.H.; Yang, T.K.; Lee, S.J.; Song, J.M. Determination of the dose-depth distribution of proton beam using resazurin assay in vitro and diode laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *593*, 214–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Czekanska, E.M. Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *740*, 27–32. [[PubMed](#)]
13. Szenté, L.; Szemán, J. Cyclodextrins in analytical chemistry: Host-guest type molecular recognition. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8024–8030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bochet, A.; Piel, G. Applications of cyclodextrins for skin formulation and delivery. In *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics and Biomedicine, Current and Future Industrial Applications*; Bilensoy, E., Ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2011; pp. 159–176.
15. Fenyvesi, É.; Vikmon, M.; Szenté, L. Cyclodextrins in food technology and human nutrition: Benefits and limitations. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2016**, *56*, 1981–2004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Jambhekar, S.S.; Breen, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: Solubilization, binding constant, and complexation efficiency. *Drug Discov. Today.* **2016**, *21*, 363–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Szejtli, J. *Cyclodextrin Technology*; Kluwer: Dordrecht, Netherlands, 1988.
18. Szenté, L.; Szejtli, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: Chemistry, properties, and trends in development. *Adv. Drug Del. Rev.* **1999**, *36*, 17–28. [[CrossRef](#)]
19. Dodziuk, H. *Cyclodextrins and Their Complexes*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2008.

20. Pal, K.; Mallick, S.; Koner, A.L. Complexation induced fluorescence and acid–base properties of dapoxyl dye with γ -cyclodextrin: A drug-binding application using displacement assays. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 16015–16022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Balabai, N.; Linton, B.; Napper, A.; Priyadarshy, S.; Sukharevsky, A.P.; Waldeck, D.H. Orientational dynamics of β -cyclodextrin inclusion complexes. *J. Phys. Chem. B.* **1998**, *102*, 9617–9624. [[CrossRef](#)]
22. Douhal, A. Ultrafast guest dynamics in cyclodextrin nanocavities. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1955–1976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hamai, S. Ternary inclusion complexes of γ -cyclodextrin with resorufin and organic cations in aqueous solution. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2007**, *80*, 1527–1533. [[CrossRef](#)]
24. Duchêne, D.; Bochot, A. Thirty years with cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **2016**, *514*, 58–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Poór, M.; Kunsági-Máté, S.; Sali, N.; Kőszegi, T.; Sente, L.; Peles-Lemli, B. Interactions of zearalenone with native and chemically modified cyclodextrins and their potential utilization. *J. Photochem. Photobiol. B.* **2015**, *151*, 63–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Poór, M.; Matisz, G.; Kunsági-Máté, S.; Derdák, D.; Sente, L.; Lemli, B. Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction of citrinin with native and chemically modified cyclodextrins. *J. Lumin.* **2016**, *172*, 23–28. [[CrossRef](#)]
27. Kumar, J.S.; Miller Jenkins, L.M.; Gottesman, M.M.; Hall, M.D. The drug excipient cyclodextrin interacts with D-luciferin and interferes with bioluminescence imaging. *Mol. Imaging.* **2016**, *15*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wang, M.S.; Boddapati, S.; Sierks, M.R. Cyclodextrins promote protein aggregation posing risks for therapeutic applications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *386*, 526–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Petrov, A.M.; Naumenko, N.V.; Uzinskaya, K.V.; Giniatullin, A.R.; Urazaev, A.K.; Zefirov, A.L. Increased non-quantal release of acetylcholine after inhibition of endocytosis by methyl- β -cyclodextrin: The role of vesicular acetylcholine transporter. *Neuroscience.* **2011**, *186*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Ijaz, M.; Matuszczak, B.; Rahmat, D.; Mahmood, A.; Bonengel, S.; Hussain, S.; Huck, C.W.; Bernkop-Schnürch, A. Synthesis and characterization of thiolated γ -cyclodextrin as a novel mucoadhesive excipient for intra-oral drug delivery. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *132*, 187–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Fenyvesi, F.; Réti-Nagy, K.; Bacsó, Z.; Gutay-Tóth, Z.; Malanga, M.; Fenyvesi, É.; Sente, L.; Váradi, J.; Ujhelyi, Z.; Fehér, P.; Szabó, G.; Vecsernyés, M.; Bácskay, I. Fluorescently labeled methyl- β -cyclodextrin enters intestinal epithelial Caco-2 cells by fluid-phase endocytosis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e84856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Choi, J.M.; Cho, E.; Lee, B.; Jeong, D.; Choi, Y.; Yu, J.H.; Jung, S. Enhancing bio-availability of β -naphthoflavone by supramolecular complexation with 6,6'-thiobis(methylene)- β -cyclodextrin dimer. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *151*, 40–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Mohtar, N.; Taylor, K.M.; Sheikh, K.; Somavarapu, S. Design and development of dry powder sulfobutylether- β -cyclodextrin complex for pulmonary delivery of fisetin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *113*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sali, N.; Csepregi, R.; Kőszegi, T.; Kunsági-Máté, S.; Sente, L.; Poór, M. Complex formation of flavonoids fisetin and geraldol with β -cyclodextrins. *J. Lumin.* **2018**, *194*, 82–90. [[CrossRef](#)]
35. Christian, A.E.; Haynes, M.P.; Phillips, M.C.; Rothblat, G.H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.* **1997**, *38*, 2264–2272. [[PubMed](#)]
36. Zidovetzki, R.; Levitan, I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 1311–1324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Milles, S.; Meyer, T.; Scheidt, H.A.; Schwarzer, R.; Thomas, L.; Marek, M.; Sente, L.; Bittman, R.; Herrmann, A.; Günther Pomorski, T.; Huster, D.; Müller, P. Organization of fluorescent cholesterol analogs in lipid bilayers—lessons from cyclodextrin extraction. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, *1828*, 1822–1828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Brehm, G.; Reiher, M.; Schneider, S. Estimation of the vibrational contribution to the entropy change associated with the low- to high-spin transition in Fe(phen)₂(NCS)₂ complexes: Results obtained by IR and Raman Spectroscopy and DFT calculations. *J. Phys. Chem. A.* **2002**, *106*, 12024–12034. [[CrossRef](#)]

39. Li, Y.; Huszthy, P.; Kunsági-Máté, S. Effect of molecular vibrations on the selectivity character of pyridino-18-crown-6 derivatives towards potassium ion. *Chem. Phys. Lett.* **2012**, *533*, 45–49. [[CrossRef](#)]
40. Cornish-Bowden, A. Enthalpy-entropy compensation: A phantom phenomenon. *J. Biosci.* **2002**, *27*, 121–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Sali, N.; Nagy, S.; Poór, M.; Kőszegi, T. Multiparametric luminescent cell viability assay in toxicology models: A critical evaluation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **2016**, *79*, 45–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds BCD, HPBCD, and DIMEB are available from CycloLab Ltd. (L.S.).



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

Green Fluorescent Protein-Based Viability Assay in a Multiparametric Configuration

Rita Csepregi^{1,2}, Viktória Temesfői^{1,2} , Miklós Poór^{2,3}, Zsuzsanna Faust¹
and Tamás Kőszegi^{1,2,*}

¹ Department of Laboratory Medicine, Medical School, University of Pécs, Ifjúság u. 13, H-7624 Pécs, Hungary; ritacsepregi93@gmail.com (R.C.); vtemesfoi@gmail.com (V.T.); faust.zsuzsanna@pte.hu (Z.F.)

² János Szentágothai Research Center, University of Pécs, Ifjúság u. 20, H-7624 Pécs, Hungary; poor.miklos@pte.hu

³ Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary

* Correspondence: tamas.koszegi@aok.pte.hu; Tel.: +36-30-491-7719; Fax: +36-72-536-121

Received: 26 May 2018; Accepted: 26 June 2018; Published: 28 June 2018



Abstract: Green fluorescent protein (GFP) is considered to be suitable for cell viability testing. In our study, GFP transfected A549 lung carcinoma cell line was treated with sodium fluoride (NaF), cycloheximide (CHX) and ochratoxin A (OTA). GFP fluorescence, intracellular ATP, nucleic acid and protein contents were quantified by a luminescence microplate assay developed in our laboratory. Flow cytometry was used to confirm the findings and to assess the intensity of GFP during different types of cell death. A 24 h NaF and CHX exposure caused a dramatic decrease in ATP contents ($p < 0.05$) compared with those of the controls. GFP fluorescence of the cells was in close correlation with total protein; however, GFP/ATP increased at NaF and decreased at CHX treatments ($p < 0.05$). ATP/protein and ATP/propidium iodide (PI) were largely decreased at NaF exposure in a dose-dependent manner ($p < 0.05$), while CHX and OTA showed markedly fewer effects. Both treatments caused apoptosis/necrosis at different rates. NaF induced mainly late apoptosis while OTA, mainly apoptosis. CHX effects varied by the incubation time with 100-fold elevation in late apoptotic cells at 24 h treatment. GFP intensity did not show a significant difference between live and apoptotic populations. Our results suggest when using GFP, a multiparametric assay is necessary for more precise interpretation of cell viability.

Keywords: microplate assay; flow cytometry; green fluorescent protein; cell viability

1. Introduction

Cell viability and cytotoxicity tests are frequently used assays, based on the general considerations about cell death. Live and dead cells can be distinguished by certain dyes that require intracellular enzymatic activity or by their characteristics to enter the cells only if the plasma membrane integrity is compromised. Cell adherence and the capability to form colonies also gives information on viability. Cytotoxicity can also be assessed by detecting the intracellular protein release. Another significant goal in this regard is the application of methods including metabolic parameters as well [1].

The molecular basis of green fluorescent protein (GFP) tag/protein expression provides us with a picture about the background of how GFP fluorescence can be used in connection with cell viability [2–7]. Depending on the construct used for transfection, it can be co-expressed with a specific protein, regulated by the promoter of the protein of interest or randomly integrated into the genome with an own promoter sequence. In our constellation, the HIV-derived lentivectors are stably transfected into A549 lung carcinoma cell line under the control of a cytomegalovirus (CMV) promoter [8]. As Soboleski and colleagues demonstrated, the yield of GFP messenger ribonucleic

acid (mRNA) and the average fluorescence intensity of GFP protein were proportional in *in vitro* studies, where GFP expression was put under the control of three different eukaryotic promoters. Thus, GFP fluorescence intensity was shown to be in correlation with transcriptional activity. Based on these findings, it is a powerful and easily measurable quantitative reporter to detect changes in gene expression [9]. Transcriptional activity and protein synthesis depend strongly on the general energy supply of the cells. Energy is stored in the chemical bonds of adenosine triphosphate (ATP) molecules, which are end products of metabolic pathways. Intracellular ATP level is widely used to determine the viability and to estimate the metabolic efficiency of cells [10–13]. The luminescence-based ATP assays are the most precise and sensitive assays in the microplate technology available in cell viability studies, although, detecting ATP as a marker of viability has its limitations. It has to be emphasized, that depletion of the ATP level does not always infer lethal alterations [1]. In our study, using metabolic and protein synthesis inhibitors and a generally toxic compound we analyzed the cellular metabolism and protein synthesis pathways from the endpoint to obtain information on the changes of GFP expression/intensity by affecting the production of ATP. Thus, including other cytotoxicity/viability markers, we can infer the applicability of GFP fluorescence regarding cell viability.

Anti-metabolic effects of sodium fluoride (NaF) manifests mainly through influencing the activity of the enzymatic system [14]. This involves the inhibition of glycolytic enzymes which largely contribute to the ATP production, especially in tumorigenic cells, where most of the energy yield depends on glycolysis, even when the oxygen supply is sufficient, and oxidative phosphorylation is functioning (Warburg effect) [15,16]. Cycloheximide (CHX) is a widely used compound to inhibit eukaryote protein synthesis. It is known to stop translation during the elongation phase by binding the 60S ribosomal subunit [17]. The complex effect of ochratoxin A (OTA) is mediated particularly through the induction of oxidative stress. Several processes are involved in its toxicity, such as lipid peroxidation, inhibition of protein synthesis, mitochondrial pathways, and damage of the DNA [18,19].

Apoptosis and necrosis can be differentiated by well-characterized physiological and biochemical processes. During necrosis, the main features are disruption of the plasma membrane and intracellular organelles, loss of cellular content or swelling can be observed.

To diagnose apoptosis, there are some good points to rely on, such as the morphological changes, caspase activity, and phosphatidyl serine (PS) externalization. Apoptotic cells keep their intact plasma membrane until the late phases of the process. Before dying cells meet the criteria to be considered dead, events may be reversible in some cases. Based on the recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death, cells can be determined as dead among others by the loss of the plasma membrane integrity which can be identified with viability dyes, such as propidium iodide (PI) and 7-aminoactinomycin D (7AAD) [20].

In our previous study, calcein acetoxymethyl ester (CAM) dye was used for viability testing, but its applicability to discriminate live/dead cells seemed to be questionable. The ATP depleted Madin-Darby canine kidney (MDCK), and liver hepatocellular carcinoma (HepG2) cells took up the CAM dye at the same kinetics as the untreated control cells, and the same extent of fluorescence was detected in these two groups [10].

In the present work, we attempted to find coherence between the intensity of GFP fluorescence, intracellular ATP yield, nucleic acid content (approximate cell number), and total protein level for estimation of the viability of cells after treatment with metabolic poisons. To answer the question, we modified and combined our previously published plate reader-based cell viability assay [10,11] with GFP fluorescence detection. To specify our findings further, we invoked flow cytometry as well which allowed us to study the GFP signal during the toxin-induced apoptotic and necrotic processes.

2. Results

2.1. Microplate Assay

The ATP content showed significant changes in each treatment. The strongest depletion was detected during NaF exposure. At 20 mM NaF concentration, ATP was reduced to approximately 2% compared with the control. CHX in 4 h elevated the ATP level, while 24 h incubation caused a significant decrease. Treatments with OTA reduced the intracellular ATP levels as well. Each compound caused dose-dependent alterations, as shown in Table 1.

Table 1. Effects of various treatments on the adenosine triphosphate (ATP) content of A549-GFP cells. Data are expressed in % of the control. Mean \pm SD of 4 independent experiments, $n = 4 \times 16$ replicates for each concentration. ^a: Significant change compared to the control (one-way ANOVA test, $p < 0.05$).

Treatment Groups		ATP Content (%)	
NaF	4 h	Control	100.00 \pm 3.03
		2.5 mM	31.94 \pm 1.47 ^a
		5 mM	14.94 \pm 0.76 ^a
		10 mM	5.06 \pm 0.37 ^a
		15 mM	2.44 \pm 0.25 ^a
		20 mM	2.11 \pm 0.22 ^a
CHX	4 h	Control	100.00 \pm 3.39
		0.02 nM	118.32 \pm 4.16 ^a
		0.04 nM	117.87 \pm 4.26 ^a
		0.08 nM	113.46 \pm 5.06 ^a
		0.18 nM	109.25 \pm 3.04 ^a
		0.35 nM	104.95 \pm 3.54 ^a
CHX	24 h	Control	100.00 \pm 2.53
		0.02 nM	56.18 \pm 1.91 ^a
		0.04 nM	52.56 \pm 2.31 ^a
		0.08 nM	50.37 \pm 1.11 ^a
		0.18 nM	47.46 \pm 0.99 ^a
		0.35 nM	48.30 \pm 1.03 ^a
OTA	24 h	Control	100.00 \pm 1.99
		5 μ M	97.65 \pm 2.26 ^a
		12.5 μ M	92.99 \pm 3.42 ^a
		20 μ M	81.98 \pm 3.23 ^a

We found a strong correlation between the GFP fluorescence intensity, cell number, and total protein content during treatments and a remarkably significant difference could be detected in the case of NaF exposure influencing ATP levels correlated to GFP intensity, cell number and protein content and also, at 4 h CHX treatment influencing ATP levels correlated to GFP intensity ($p < 0.0001$). Results are demonstrated in Figure 1.

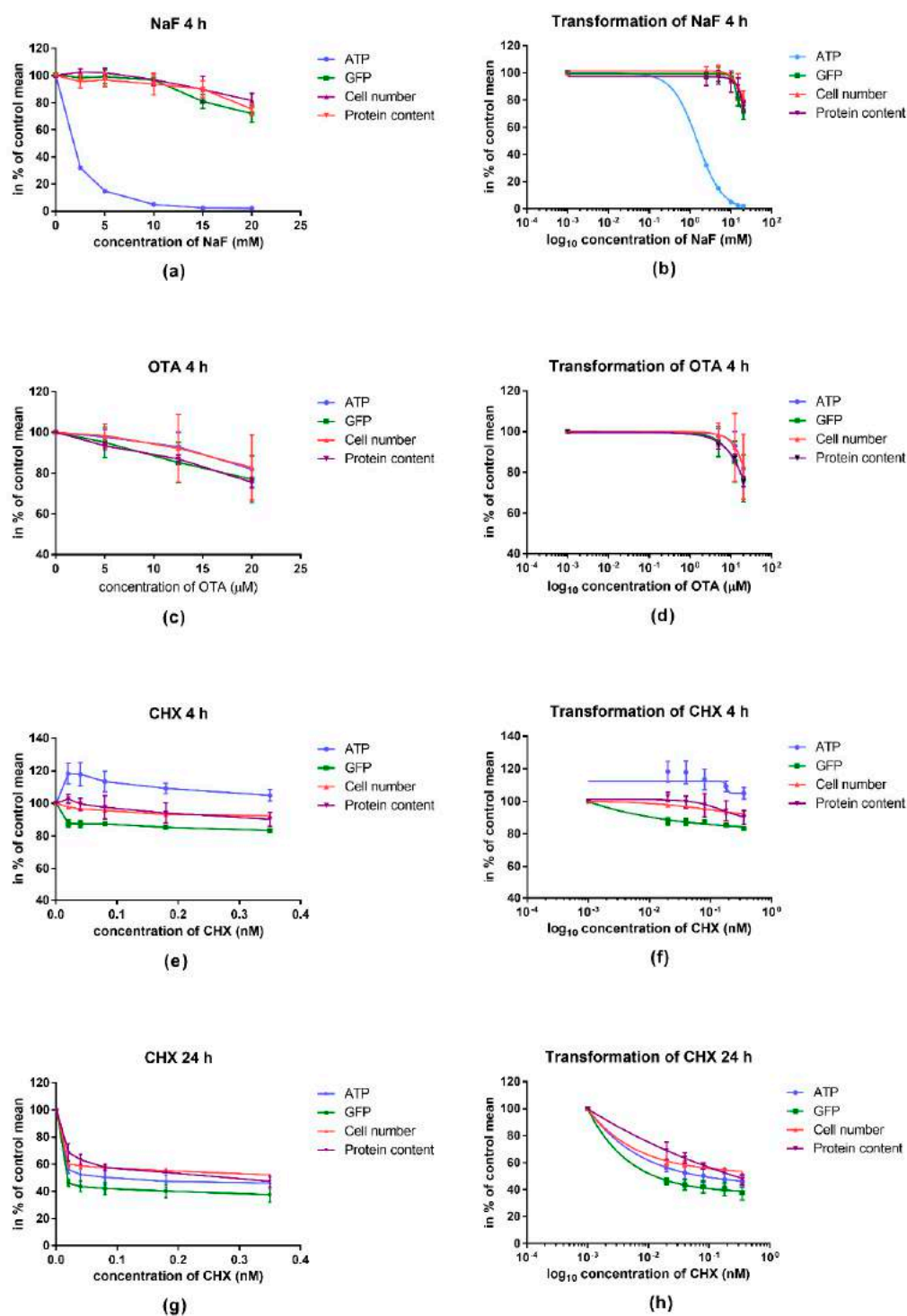


Figure 1. Dose-response fitting of the results regarding the four measured parameters. (a) Graphs of absolute parameters of sodium fluoride (NaF); (c) Ochratoxin A (OTA); (e) Cycloheximide (CHX) 4 h; (g) CHX 24 h. Dose-response curves of (b) NaF; (d) OTA; (f) CHX 4 h; (h) CHX 24 h, created by log₁₀ transformation and nonlinear curve fitting. Correlation coefficients (R^2) in NaF treatment: Adenosine triphosphate (ATP) 0.9993, green fluorescent protein (GFP) 0.8925, cell number 0.7259, protein content 0.7257. Correlation coefficients (R^2) in OTA treatment: ATP 0.7004, GFP 0.5938, cell number 0.3022, protein content 0.9586. Correlation coefficients (R^2) in CHX 4 h treatment; ATP 0.1225, GFP 0.9366, cell number 0.8959, protein content 0.4892. Correlation coefficients (R^2) in CHX 24 h treatment; ATP 0.9666, GFP 0.9746, cell number 0.9898, protein content 0.9647. Data are represented in percentage of control mean \pm SD of 4 independent experiments, $n = 4 \times 16$ replicates for each concentration. Analysis was carried out by comparing the logIC₅₀ values of the measured parameters using extra sum-of-squares F test (comparison of fits) ($p < 0.0001$).

Figure 2 represents the ratios of the measured parameters. Regarding NaF treatment, we observed a strong decrease in the ATP/protein and ATP/cell number ratios while the GFP/ATP quotient showed significant elevation, interestingly. OTA increased the ATP/protein ratio significantly, other quotients showed a decrease, but the change is less steep compared to the alterations caused by NaF. Short-time incubation with CHX caused elevated ATP/protein and ATP/cell number ratios but reduced the GFP/ATP quotient significantly. During 24 h CHX treatment, along with the lower ATP content, the corresponding ratios showed to be lower as well.

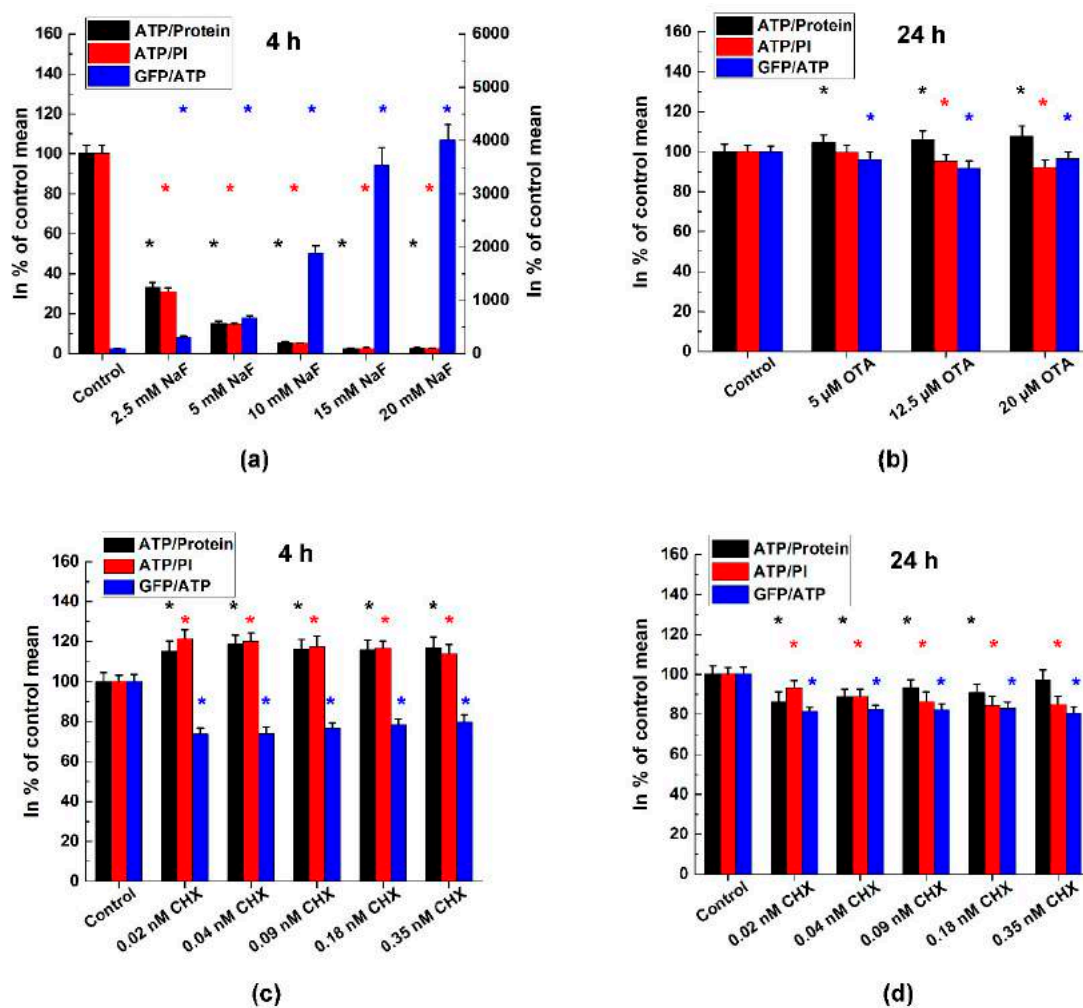


Figure 2. ATP/Protein, ATP/propidium iodide (PI) and GFP/ATP ratios in % of the control. We used Hanks' solution as control of the NaF treatment. Mean \pm SD of 4 independent experiments, $n = 4 \times 16$ replicates for each concentration. Effects of (a) NaF; (b) OTA; and (c,d) CHX treatments of A549-GFP cell line. *: significant change vs. control (one-way ANOVA test, $p < 0.05$).

2.2. Flow Cytometry

In the flow cytometry experiments, first, we investigated the effect of the compounds on cell death regarding four different populations, defined by fluorescence minus one (FMO) controls. These populations are the $PI^- Annexin V^-$ (live), $PI^+ Annexin V^-$ (cells with compromised membrane, without PS externalization), $PI^- Annexin V^+$ (cells with externalized PS) and the $PI^+ Annexin V^+$ (double positive) cells. Figure 3 indicates the percentage distribution of these populations in the treated cells. An example of the gating strategy can be seen in Figure S1.

NaF showed apoptosis-inducing and necrotic effects, as it is seen by the dose-dependent increase of the necrotic and late apoptotic populations, while the percentage of the apoptotic cells remained

approximately constant across different concentrations. OTA seemed to induce apoptosis rather than necrosis in this experimental design and circumstances, as we found the necrotic population to decrease dose-dependently, while the apoptotic and the double positive cell number tended to increase compared with the control. The effect of CHX was time-dependent. Comparing the short (4 h) and the long (24 h) treatments, an approximately tenfold growth of the necrotic and a hundredfold growth of the late apoptotic population is remarkable with an elevation in the number of the apoptotic cells as well.

We investigated the fluorescence intensity of expressed GFP in the different populations defined by PI and Annexin V positivity, as indicated in Figure 4. In all the treatments, a significant difference was observed between the negative vs. double positive, the negative vs. PI⁺ Annexin V⁻, the PI⁺ Annexin V⁻ vs. PI⁻ Annexin V⁺ and the PI⁻ Annexin V⁺ vs. double positive populations. There was no significant difference detected between the PI⁺ Annexin V⁻ vs. double positive and the live vs. PI⁻ Annexin V⁺ apoptotic populations, suggesting that the loss of the GFP signal meets the criteria of cell death, where membrane damage occurs, while during the apoptotic process, the GFP signal still can be detected. Figure S2 shows an example of the GFP intensity represented by histograms in control samples and in different treatments.

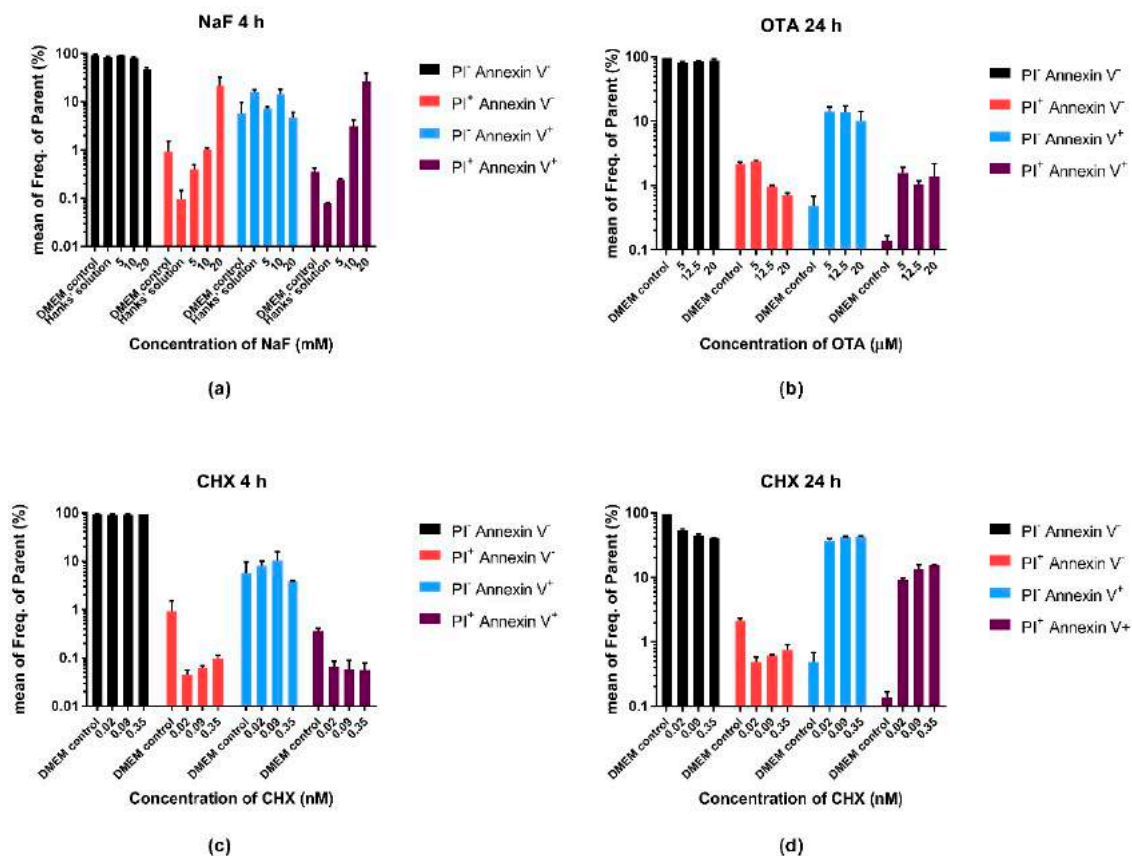


Figure 3. Effects of different treatments on cell death; (a) NaF; (b) OTA; and (c,d)CHX. Percentage distribution of Annexin V⁺, PI⁺, negative and double positive cells in the parental gate (A549 cells defined by side scatter area (SSC-A)/forward scatter area (FSC-A) presented on a log₁₀ scale. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) is the absolute control of the measurements, Hanks' solution is the control of the NaF treatment.

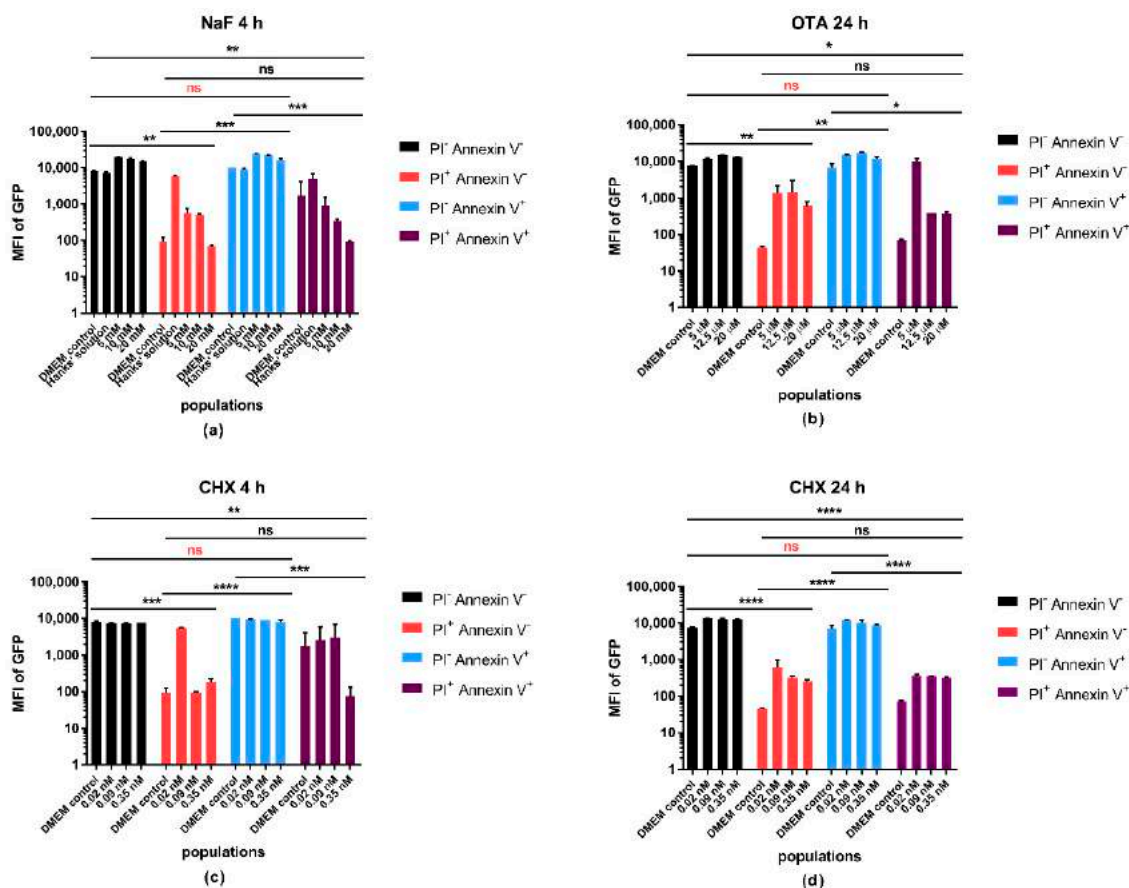


Figure 4. Fluorescence intensity of GFP within the PI⁻ Annexin V⁻, PI⁺ Annexin V⁻, PI⁻ Annexin V⁺ and PI⁺ Annexin V⁺ double-positive populations. Effects of (a) NaF; (b) OTA; and (c,d) CHX on the fluorescence intensity of GFP in A549 cell line. DMEM serves as absolute control of the measurements, Hanks' solution as the control of the NaF treatment. Fluorescence data showed nonparametric distribution, thus, means of medians are shown on the graph (two technical replicates for each treatment). Error bars represent the standard deviation (SD). One-way ANOVA and Tukey's post hoc test were performed to obtain between-group differences. *: significant difference ($p < 0.05$), **: significant difference ($p < 0.01$), ***: significant difference ($p < 0.001$), ****: significant difference ($p < 0.0001$). ns: no significance, ns: no significant difference between live and apoptotic populations.

3. Discussion

Microplate assays are widely used in drug and cytotoxicity testing. It is a fast screening method providing high-throughput data from small quantities of test samples. We developed a sensitive and rapid extraction method which allows us to explore the intracellular protein and ATP contents in one step to reduce time and to avoid the possibility of errors. In this study, we examined the impact of three different chemicals on GFP transfected A549 cell line to reveal the correlation between the GFP fluorescence and a metabolism-related viability parameter. We studied the GFP fluorescence intensity during apoptosis and necrosis using the commercial live/dead discrimination and apoptosis detection.

The manner of cell disruption is a cornerstone of microplate-based assays investigating intracellular biochemical parameters. Several cell lysis techniques exist depending on the purpose of the experiment or cell type: Mechanical, physical, chemical, and biological methods. There are experiments using mild procedures, such as freezing, osmosis, fast ultrasonic lysis at low temperature or several types of detergents, like sodium dodecyl sulphate (SDS) and Triton X-100 [21]. As the development of a previously published method [10], we applied a boric acid buffer at alkaline pH supplemented with Triton X-100 and ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) to mobilize and

stabilize total protein and ATP contents of adherent cell cultures at the same time. This helps to avoid repeated pipetting, causing uneven distribution or loss of cells from the wells.

There is no surprise that the GFP signal intensity moves along with cell number and protein content of the cells. Its expression is under the control of an external promoter, but the general capability of the cells to transcribe and translate gene sequences into proteins has a clear impact on the synthesis of the fluorescent protein as well. In the microplate-based experiments, the most remarkable changes can be observed when NaF, as a general inhibitor of the enzymatic system, is used. The GFP/ATP ratio can still be higher or elevate dose-dependently, even if the ATP content drops down significantly without any change in the total protein level. This observation supports our suggestion that ATP determination solely may not always be an adequate viability parameter. 4 h treatment with CHX caused elevation of the ATP content, which can be attributed to its apoptosis inducing effects through the inhibition of protein synthesis. Apoptotic processes require energy to guide through the downstream program seamlessly [22,23]. On the other hand, increase of ATP does not obligatorily mean an increased production but might be the result of less utilization. Protein synthesis is strongly energy dependent therefore, if CHX inhibits the protein synthesis pathways then it might result in accumulation of unused ATP in the cells. The results of the 24 h CHX treatment let us conclude that we see a rather advanced apoptotic outcome with an increasing PI and Annexin V double positive population and reduced ATP/protein, ATP/cell number ratios. OTA is included into the study to learn how complex cytotoxic effects influence the fluorescence intensity of GFP. It is difficult to determine the exact cellular targets of the toxin and this study was not meant to investigate it further; however, we can ascertain that the decrease of the fluorescence intensity represented the cell destruction.

The main reason for the loss of GFP signal at the endpoint of cell death is the leakage, loss, and degradation of the intracellular content resulted from the perforation of the membrane. Apoptosis and other types of cell death, during which cells remain intact until the late phases, require more attention in this regard. The GFP fluorescence showed much lower differences between the live and apoptotic populations than between live and necrotic, apoptotic and necrotic, or any other combinations. GFP fluorescence can be detected from these cells as long as the transcriptional and translational processes are functioning to satisfy the needs of the cells during the programmed process, no harsh disruption is happening, and cellular integrity is kept. In the flow cytometry investigation, it is possible to sharply demarcate apoptotic and necrotic cell groups using appropriate markers, but in microplate assays if viability experiments are based only on the GFP intensity, apoptotic cells can also contribute with their fluorescence to falsely assume the whole population to be live or more viable.

While measuring ATP, it has to be taken into account that apoptotic processes require a higher elevated energy level than measured in the control cells; it is a prerequisite of programmed cell death [23]. Thus detecting higher ATP content does not always mean higher cell viability. The situation is similar regarding the fluorescence intensity of expressed GFP. Every observation made in cell viability and cytotoxicity testing has to be based on well-established protocols and multiparametric measurements to have a precise view on the tested effects and to avoid inaccuracy and irreproducible results.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Culture

GFP transfected A549 adherent lung cancer cell culture (ATCC CCL-185) was a kind gift from Krisztián Kvell. The A549 cell line was sorted with FACS Aria II (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) instrument to get nearly 100% of GFP positivity. The transfection was carried out using HIV-1-derived lentivectors [8]. A549-GFP cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma, Saint Louis, Missouri) with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 µg/mL) at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified incubator.

4.2. Chemicals and Treatments

Ochratoxin A (OTA), cycloheximide (CHX), propidium iodide (PI), fluorescamine (fluram) and Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) were purchased from Sigma-Aldrich. Sodium fluoride (NaF) was from Acros Organics (part of Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts). NaF was used dissolved in glucose containing homemade Hanks' solution during the treatments. For cellular measurements, we used phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and ATP measurement buffer (0.1 M Tris/acetate, 2 mM EDTA, 10 mM MgSO₄, pH 7.75), fetal bovine serum (FBS, Pan-Biotech, Aidenbach, Germany), Bioluminescent ATP Assay Kit CLSII (Roche, Basel, Switzerland), Triton X-100 (Roche), and bovine serum albumin (BSA, Biosera, Nuaille, France) were used as received. Annexin binding buffer (10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4) was homemade, Annexin V-Pacific blue was from Life Technologies (Carlsbad, California). Treatments were carried out in the concentrations described in Table 2.

Table 2. Concentrations and duration of treatments in the microplate assay and flow cytometry measurements.

Treatment	Time (h)	Microplate Assay	Flow Cytometry
OTA	24	5 µM, 12.5 µM, 20 µM	5 µM, 12.5 µM, 20 µM
CHX	24 4	0.02 nM, 0.04 nM, 0.09 nM, 0.18 nM, 0.35 nM	0.02 nM, 0.09 nM, 0.35 nM
NaF	4	2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM	10 mM, 15 mM, 20 mM

4.3. Microplate Assay

Following the treatment, cells were washed three times with calcium and magnesium-containing PBS to remove the debris. Cells were solubilized using 200 µL 0.1% Triton X-100 non-ionic detergent containing borate buffer (pH 9.2) supplemented with 10 mM EDTA and were placed on a shaker for 5 min. The microplate cytotoxicity assay is based on a multiparametric measurement [10]. ATP was determined by the luciferin/luciferase technique [10] adapted for microplate method. To measure the ATP content, lysed samples were transferred into 96-well white optiplates, 20 µL/well each. 200 µL of dissolved ATP reagent was added to the wells. The working concentration of PI staining was 2 µg/mL in PBS. The extracted samples were incubated for 5 min at room temperature in the dark, and after a short shaking they were measured on plate reader (Enspire Multimode reader, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts) at λ_{exc} 530 nm and λ_{em} 620 nm wavelengths. Fluorescence intensity of GFP was measured at λ_{exc} 480 nm and λ_{em} 520 nm wavelengths. We used fluorescamine (0.3 mg/mL dissolved in acetone) to determine the intracellular protein content. Bovine serum albumin standard was used to generate linear regression calibration curve. Protein concentration was determined in the range of 20–100 mg/L. 20 µL/well borate buffer-lysed sample/standard was transferred into a 96-well standard plate. After pipetting 150 µL of 0.1% Triton X-100 containing borate buffer into the wells, 50 µL of fluram/acetone was rapidly added to each well. After a short shaking, fluorescence intensity was measured on the plate reader at λ_{exc} 385 nm and λ_{em} 490 nm wavelengths.

4.4. Flow Cytometry

Before the experimental procedure, depending on the treatment time 8×10^5 and 6×10^5 cells were pipetted into 6-well tissue culture plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Following overnight incubation, the medium was replaced with the treating medium, containing OTA, CHX, and NaF (as shown in Table 1).

Following incubation at 37 °C and 5% CO₂, supernatant was collected separately from each well, cells were trypsinized, and centrifuged together with the previously obtained supernatant at 400 g and 4 °C for 5 min. The pellet was washed once in Annexin binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4). Samples were analyzed immediately on a BD FACS Canto II flow cytometer

(Becton Dickinson and Company). Analysis was carried out with FlowJo v10 data analysis software (FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA).

To detect the externalized PS residues as apoptotic markers, the GFP expressing A549 cells were labeled with Pacific Blue conjugated Annexin V in Annexin binding buffer according to the manufacturers' protocol, on ice. PI was used to specify the necrotic cells with compromised membrane at the working concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. During the spectral overlap compensation process A549 cells were treated with tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) to serve positive control for apoptosis. Necrosis was generated by heat exposure for positive control of PI staining. FMO controls were applied to set the gates properly. The concentrations of OTA, CHX, and NaF for the flow cytometry measurements were selected based on the results of the microplate assay.

4.5. Statistical Evaluation

Treatments for microplate measurements were carried out on four plates and 16 technical replications. The obtained data were averaged separately and compared in percentages of the mean of the untreated control \pm SD (100% \pm SD). We used one-way ANOVA, where the control and the data of one type of treatment were compared. A paired T-test was performed for comparison of data sets for GFP, PI, and protein values with each other and the trend between GFP and PI, or GFP and total protein content in the cell line was examined. Flow cytometry experiments were performed in duplicates. To compare the distribution of different populations within treatments, percent distributions of technical replicates were averaged and the mean was presented on a log₁₀ scale to make low values visible. Fluorescence intensity of GFP showed nonparametric distribution. Medians were averaged separately in each concentration and controls of each treatment. One-way ANOVA and Tukey's post hoc tests were performed to obtain between-group differences. The level of significance was set at $p < 0.05$. The work was carried out in SPSS Statistics (version 22, IBM, Armonk, NY, USA) and GraphPad Prism 7 (version 7, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) softwares.

5. Conclusions

There are some remarkable considerations to be mentioned. In the present study we learned the behaviour of intracellular ATP level in correlation with GFP expression as an indicator of viability. Our results suggest, that decrease in GFP fluorescence is not always in correlation with the intracellular ATP content. In the case of stable transfection of the fluorescent protein into the genome with an own promoter sequence, it can be used as a cell viability marker, but the impact of the tested compound on the type of cell death and the duration of treatment must be taken in account. Our suggestion is to perform multiparametric measurements when applying expressed GFP, along with conventional live/dead discrimination and including a metabolic parameter as well, to get more reliable information from the experiments.

Supplementary Materials: The followings are available online, Figure S1: Gating strategy in the flow cytometry experiments. Flow stability was checked by forward scatter area (FSC-A)/Time gate, single cells were discriminated by FSC-Height/FSC-A, A549 cells were determined on side scatter area (SSC-A)/FSC-A plots. Gates in the PI/Annexin V-PB plots were set based on fluorescence minus one controls; Figure S2: GFP intensity on histograms. Intensity of expressed GFP in control samples and different treatments; DMEM 4 h (a), DMEM 24 h (b), NaF (c), OTA (d), CHX 4 h (e), CHX 24 h (f). Four histograms are shown from each example file which represent the four populations defined by propidium iodide (PI) and Annexin V (PI^+ Annexin V^- , PI^+ Annexin V^+ , PI^- Annexin V^+ , PI^- Annexin V^-). We took the highest concentrations from each treatment to be represented in the figure.

Author Contributions: R.C. and V.T. contributed to the study equally. T.K. conceived and designed, R.C. and V.T. designed and performed the experiments. R.C. and V.T. analyzed the data. M.P. contributed with reagents and final corrections of the paper. Z.F. contributed with analysis tools. V.T., R.C., and T.K. wrote the paper. All authors have read, edited, and approved the final version of the paper.

Funding: This research was funded by University of Pécs, Medical School (PTE ÁOK-KA-2016-04 grant [T.K.]). The work was partially supported by GINOP-2.3.2-15-2016-00021 "The use of chip-technology in increasing the effectiveness of human in vitro fertilization" and NKFI-EPR K/115394/2015 "Early biochemical indicators of

embryo viability” grants. The project was also supported by University of Pécs in the frame of Pharmaceutical Talent Centre program (M.P.).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Méry, B.; Guy, J.B.; Vallard, A.; Espenel, S.; Ardail, D.; Rodriguez-Lafrasse, C.; Rancoule, C.; Magné, N. In Vitro Cell Death Determination for Drug Discovery: A Landscape Review of Real Issues. *J. Cell Death* **2017**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Tsien, R.Y. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Snapp, E. Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2005**, *27*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Strebel, A.; Harr, T.; Bachmann, F.; Wernli, M.; Erb, P. Green fluorescent protein as a novel tool to measure apoptosis and necrosis. *Cytometry* **2001**, *43*, 126–133. [[CrossRef](#)]
5. Steff, A.M.; Fortin, M.; Arguin, C.; Hugo, P. Detection of a decrease in green fluorescent protein fluorescence for the monitoring of cell death: An assay amenable to high-throughput screening technologies. *Cytometry* **2001**, *45*, 237–243. [[CrossRef](#)]
6. Tsuji, K.; Yamauchi, K.; Yang, M.; Jiang, P.; Bouvet, M.; Endo, H.; Kanai, Y.; Yamashita, K.; Moossa, A.R.; Hoffman, R.M. Dual-color imaging of nuclear-cytoplasmic dynamics, viability, and proliferation of cancer cells in the portal vein area. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 303–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Yang, M.; Jiang, P.; Hoffman, R. Whole-body subcellular multicolor imaging of tumor-host interaction and drug response in real time. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 5195–5200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Kvell, K.; Nguyen, T.; Salmon, P.; Glauser, F.; Werner-Favre, C.; Barnet, M.; Schneider, P.; Trono, D.; Zubler, R. Transduction of CpG DNA-stimulated primary human B cells with bicistronic lentivectors. *Mol. Ther.* **2005**, *12*, 892–899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Soboleski, M.; Oaks, J.; Halford, W. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. *FASEB J.* **2005**, *19*, 440–442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Sali, N.; Nagy, S.; Poor, M.; Koszegi, T. Multiparametric luminescent cell viability assay in toxicology models: A critical evaluation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2016**, *79*, 45–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Koszegi, T.; Petrik, J.; Vladimir-Knezevic, S.; Nagy, S. Co-determination of ATP and proteins in Triton X 100 non-ionic detergent-opened monolayer cultured cells. *Luminescence* **2007**, *22*, 415–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bradbury, D.; Simmons, T.; Slater, K.; Crouch, S. Measurement of the ADP: ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis. *J. Immunol. Methods* **2000**, *240*, 79–92. [[CrossRef](#)]
13. Slater, K. Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 70–74. [[CrossRef](#)]
14. Barbier, O.; Arreola-Mendoza, L.; Del Razo, L. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem.-Biol. Interact.* **2010**, *188*, 319–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Warburg, O.; Geissler, A.W.; Lorenz, S. Measurement of oxygen pressure during the conversion of embryonic metabolism into Krebs cycle metabolism. *Z. Naturforsch. B* **1965**, *20*, 1070–1073. [[PubMed](#)]
16. Hanahan, D.; Weinberg, R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Schneider-Poetsch, T.; Ju, J.; Eyler, D.; Dang, Y.; Bhat, S.; Merrick, W.; Green, R.; Shen, B.; Liu, J. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 209–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Tao, Y.; Xie, S.; Xu, F.; Liu, A.; Wang, Y.; Chen, D.; Pan, Y.; Huang, L.; Peng, D.; Wang, X.; et al. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *112*, 320–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ringot, D.; Chango, A.; Schneider, Y.; Larondelle, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem.-Biol. Interact.* **2006**, *159*, 18–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Vandenabeele, P.; Abrams, J.; Alnemri, E.; Baehrecke, E.; Blagosklonny, M.; El-Deiry, W.; Golstein, P.; Green, D.; et al. Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* **2009**, *16*, 3–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Bodzon-Kulakowska, A.; Bierzynska-Krzysik, A.; Dylag, T.; Drabik, A.; Suder, P.; Noga, M.; Jarzebinska, J.; Silberring, J. Methods for samples preparation in proteomic research. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *849*, 1–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Leist, M.; Single, B.; Castoldi, A.; Kuhnle, S.; Nicotera, P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: A switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 1481–1486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zamaraeva, M.; Sabirov, R.; Maeno, E.; Ando-Akatsuka, Y.; Bessonova, S.; Okada, Y. Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: A bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death Differ.* **2005**, *12*, 1390–1397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Article

Cytotoxic, Antimicrobial, Antioxidant Properties and Effects on Cell Migration of Phenolic Compounds of Selected Transylvanian Medicinal Plants

Rita Csepregi ^{1,2}, Viktória Temesfői ^{1,2} , Sourav Das ^{1,2} , Ágnes Alberti ³ ,
Csenge Anna Tóth ³ , Róbert Herczeg ², Nóra Papp ⁴ and Tamás Kőszegi ^{1,2,*}

¹ Department of Laboratory Medicine, University of Pécs, Medical School, Ifjúság u. 13, 7624 Pécs, Hungary; ritacsepregi93@gmail.com (R.C.); vtemesfoi@gmail.com (V.T.); pharma.souravdas@gmail.com (S.D.)

² János Szentágothai Research Center, University of Pécs, Ifjúság u. 20, 7624 Pécs, Hungary; herczeg.robert@pte.hu

³ Department of Pharmacognosy, Semmelweis University, Üllői út 26, 1085 Budapest, Hungary; albertiagnes@gmail.com (Á.A.); csenge512@gmail.com (C.A.T.)

⁴ Department of Pharmacognosy, University of Pécs, Faculty of Pharmacy, Rókus u. 2, 7624 Pécs, Hungary; nora4595@gamma.ttk.pte.hu

* Correspondence: tamas.koszegi@aok.pte.hu; Tel.: +36-30-491-7719; Fax: +36-72-536-121

Received: 24 January 2020; Accepted: 15 February 2020; Published: 18 February 2020



Abstract: Medicinal plants are widely used in folk medicine but quite often their composition and biological effects are hardly known. Our study aimed to analyze the composition, cytotoxicity, antimicrobial, antioxidant activity and cellular migration effects of *Anthyllis vulneraria*, *Fuchsia magellanica*, *Fuchsia triphylla* and *Lysimachia nummularia* used in the Romanian ethnomedicine for wounds. Liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS/MS) was used to analyze 50% (v/v) ethanolic and aqueous extracts of the plants' leaves. Antimicrobial activities were estimated with a standard microdilution method. The antioxidant properties were evaluated by validated chemical cell-free and biological cell-based assays. Cytotoxic effects were performed on mouse fibroblasts and human keratinocytes with a plate reader-based method assessing intracellular adenosine triphosphate (ATP), nucleic acid and protein contents and also by a flow cytometer-based assay detecting apoptotic–necrotic cell populations. Cell migration to cover cell-free areas was visualized by time-lapse phase-contrast microscopy using standard culture inserts. *Fuchsia* species showed the strongest cytotoxicity and the highest antioxidant and antimicrobial activity. However, their ethanolic extracts facilitated cell migration, most probably due to their various phenolic acid, flavonoid and anthocyanin derivatives. Our data might serve as a basis for further animal experiments to explore the complex action of *Fuchsia* species in wound healing assays.

Keywords: *Anthyllis vulneraria*; *Fuchsia magellanica*; *Fuchsia triphylla*; *Lysimachia nummularia*; antimicrobial activity; antioxidant capacity; fibroblasts; keratinocytes; cytotoxicity; cell migration

1. Introduction

Nowadays, the investigation of natural extracts from medicinal plants has been increased due to their rich content of bioactive compounds such as polyphenols, vitamins and proteins, which are found in different parts of plants [1]. Phenolic compounds (flavonoids, phenolic acids, anthocyanins, tannins) are secondary metabolites, which play a crucial role in the pharmaceutical sciences, thanks to their extensive biological effects (antimicrobial, antioxidant, anticancer properties). These bioactive substances have diverse basic structures but possess an aromatic ring bearing one or more hydroxyl groups, which can be related to different biological impacts [2,3].

Medicinal plants are of primary importance in several regions of Transylvania, part of Romania. In our work, four plants were selected according to the previously described ethnomedicinal and phytochemical data. These medicinal plants are widely used in Transylvania, part of Romania. Another reason to select these herbs was that there are only a few scientific records in databases on them. The selected species are applied on wounds in traditional remedies in the country. *Anthyllis vulneraria* L. (common kidney-vetch, Leguminosae) is an annual, biennial or perennial plant that occurs in fields and meadows throughout Europe [4]. In Transylvania, the aerial part is used as an antiemetic drug [5], for swelling [6], wounds [7], kidney problems and diabetes as a tea [8] and as fodder [9]. In Lueta (local name: szipókavirág), it is used for wounds and stomach disorders as a tea (Nóra Papp, unpublished data). Its aerial part contains several bioactive compounds such as flavonoids, saponins [10,11], carotenoids, tannins and phenolic acids [12]. *Lysimachia nummularia* L. (creeping Jenny, Primulaceae) is an evergreen plant which lives mostly in ditches and wet grasslands, and in some places as a cultivated species throughout Europe [4]. In the Transylvanian ethnomedicine (local name: fillérfű, fillérlapi) the aerial part is used for toothache as a decoction [6], rheumatoid arthritis [13,14], wound and abscess as a fomentation [7,9,15,16], and pain of the legs as a fomentation and bath [17]. The leaves are rich in flavonoids [18] and triterpenoid saponins [19]. *Fuchsia magellanica* Lam. and *Fuchsia triphylla* L. (hardy fuchsia and lady's eardrops, Onagraceae) are perennial cultivated plants all over in Europe, in addition, *F. magellanica* is locally naturalized, e.g., in Azores, Ireland, and Britain [4]. Fresh leaves of several *Fuchsia* varieties are ethnomedicinally applied on wounds [9], furuncles and skin inflammation as a fomentation [17,20]. Anthocyanins were detected in the flowers and berries of *Fuchsia* species [21,22], while in their leaves several flavonoids were present [23].

In our experiments, to get a comprehensive picture regarding the phenolic content, reversed-phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (RP-LC-DAD-MS/MS) was used to tentatively characterize flavonoid and phenolic acid compounds. The main effects of the active constituents of the leaf extracts of selected plants in favor of wound healing are protection against microbial infection from the external environment, scavenging of free radicals with antioxidant effects and enhancing of cell migration, proliferation, angiogenesis and collagen production in the wounded area [24–26]. Therefore, the aim of the study was to test the antioxidant activity of the leaf extracts, where conventional total antioxidant capacity (TAC) chemical tests and cell-based antioxidant methods were applied. Besides that, we evaluated the antimicrobial properties by determination of the inhibitory effect of the leaf extracts against several Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. The wound healing process means the interplay between various cell types, including neutrophils, macrophages, keratinocytes, fibroblasts, and endothelial cells [26,27]. For this reason, we applied fibroblast- and keratinocyte-based cellular models. To determine the nontoxic concentrations of the tested leaf extracts, we combined our previously published plate reader-based cell viability assay [28] with more sensitive flow cytometer-based fluorescence apoptotic–necrotic cell detection. Additionally, cell-based methods were performed by a time-lapse live imaging technique in order to measure the effects of the leaf extracts on the closure rate of standardized cell-free areas in a migration assay. These techniques enabled us to evaluate the biochemical properties of our plant extracts and to show their diverse biological effects on human keratinocyte and mouse fibroblast cell lines.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Chemicals

Luminol (3-aminophthalhydrazide), 4-iodophenol, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), horseradish peroxidase (POD), Na₂-fluorescein, AAPH (2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) dihydrochloride), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), potassium persulfate (K₂S₂O₈), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), dihydrorhodamine 123 (DHR123), quercetin, modified RPMI 1640 (supplemented with 165 mM MOPS, 100 mM glucose and 0.185 mM adenine), erythromycin, Dulbecco's

Modified Eagle Medium (DMEM), trypsin-EDTA, penicillin–streptomycin for cell culture, acetic acid and methanol of HPLC supergradient grade for LC-MS analyses, propidium iodide (PI), fluorescamine (Floram) and 7-aminoactinomycin D (7AAD) were purchased from Sigma-Aldrich/Merck (Darmstadt, Germany). 3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) was from Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany). Ethanol (96% *v/v*, spectroscopic grade), glucose, adenine, agar-agar, and hydrogen peroxide (H₂O₂) were from Reanal Labor (Budapest, Hungary), while bioluminescent ATP Assay Kit CLSII and peroxide-free Triton X 100 (TX-100) were from Roche (Mannheim, Germany). Fetal bovine serum (FBS; Pan-Biotech, Aidenbach, Germany), and bovine serum albumin (BSA; Biosera, Nuaille, France) were used. Recombinant human platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), Hanks' Balanced Salt Solution (5.5 mM glucose) and Annexin V were from Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). Highly purified water (<1.0 µS) was applied throughout the experiments. Plastic cell culture flasks and culture plates (96-well, 24-well and 6-well) were from TPP (Trasadingen, Switzerland), while standard 96-well plates were from Greiner Bio-One (Kremsmunster, Austria). For luminescence studies white 96-well optiplates were used (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

2.2. Studied Plant Taxa and Plant Extraction

Voucher specimens of the selected four plants with unique codes were deposited at the Department of Pharmacognosy, University of Pécs, Pécs, Hungary. Fresh leaves of *Anthyllis vulneraria* (*A. vulneraria*, Voucher code: TR_7) and *Lysimachia nummularia* (*L. nummularia*, Voucher code: TR_15) were collected locally in Transylvania in July 2018, while *Fuchsia magellanica* (*F. magellanica*, Voucher code: TR_10) and *Fuchsia triphylla* leaves (*F. triphylla*, Voucher code: TR_9) were collected in June 2018 from the Botanical Garden of the University of Pécs, Pécs, Hungary.

Plant samples were dried at room temperature and stored in the dark. The plant extraction was performed according to the method of Lee et al. with some modifications [29]. The aqueous and ethanolic extracts were obtained by extracting 3 g of leaf powder in 30 mL of 50% (*v/v*) ethanol or distilled water on an orbital shaker (Dual-Action Shaker KL2, Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Germany) at room temperature overnight (200 rpm). The extracts were filtered through a 0.45 µm pore-size syringeless filter (Whatman Mini-UniPrep, Maidstone, United Kingdom), and further concentrated using a rotary vacuum evaporator (Rotavapor R-3, Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland). Amounts between 70–80 mg were obtained, which were dissolved in 1 mL of 50% (*v/v*) ethanol or distilled water. All prepared aqueous and ethanolic extracts were stored at –20 °C until the experiments were performed.

2.3. Analyses of Phenolic Compounds by HPLC with Diode-array Detector and Electrospray Ionization with MS

2.3.1. HPLC Conditions

The chromatographic separation was performed on an Agilent 1100 HPLC system equipped with a G1379A degasser, G1312A binary gradient pump, G1329A autosampler, G1316A column thermostat and G1315C diode array detector (DAD) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Samples were separated on a Zorbax SB-C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (150 mm length, 3.0 mm i.d., 3.5 µm particle diameter) column, maintained at 25 °C. The mobile phase was composed of 0.3% acetic acid in water (*v/v*) (A) and methanol (B). The following gradient program was applied, at a flow rate of 0.3 mL/min with the composition of the mobile phase changing from 5% B to 100% B in 30 min, maintaining 100% B for 5 min and returning to 5% B in 1 min. All aqueous solvents were filtered through MF-Millipore (Millipore, Billerica, MA, USA) (0.45 µm, mixed cellulose esters) membrane filters. Chromatograms were acquired at 280 nm. Injection volume was 5 µL. Prior to injection, all samples were filtered through Sartorius (Goettingen, Germany) Minisart RC15 (0.2 µm) syringe filters.

2.3.2. MS Conditions

Mass spectrometric analyses were performed with an Agilent 6410B triple quadrupole equipped with an electrospray ionization source (ESI) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). ESI conditions were as follows: temperature: 350 °C, nebulizer pressure: 40 psi, N₂ drying gas flow rate: 9 L/min, fragmentor voltage: 120 V, capillary voltage: 4000 V, collision energy was changed between 10 eV and 45 eV, depending on the analyzed structure. High purity nitrogen was used as collision gas. Full mass scan spectra were recorded in negative and for anthocyanins in positive ionization mode over the range of *m/z* 50–1000 Da (scan/s). The MassHunter B.01.03 software was used for data acquisition and qualitative analysis.

2.4. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC₈₀) with Microdilution Method

All the bacterial strains were collected from Szeged Microbiology Collection (SZMC), Department of Microbiology, University of Szeged, Hungary, and from Pécs Microbiology Collection (PMC), Department of General and Environmental Microbiology, Institute of Biology, University of Pécs, Hungary. Tested strains were the followings: *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*, SZMC strain: 0209), *Escherichia coli* (*E. coli*, PMC strain: 201), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC strain: 29213), *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*, SZMC strain: 0119) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, PMC strain: 103).

The microdilution method was performed according to a previously published method with some modifications [30]. In brief, 100 µL of bacterial suspensions (10⁵ CFU/mL) in modified RPMI 1640 and 100 µL of diluted aqueous or 50% (*v/v*) ethanolic leaf extracts in modified RPMI 1640 media were pipetted into each well of sterile 96-well plates. The sterile medium was considered as negative control, the inoculated RPMI 1640 without any treatment was taken as the bacterial growth control, while erythromycin was used as positive control. The final concentration of the ethanolic solvent for the dilution was restricted up to 1.0% *v/v* in the wells. The absorbance was measured at 595 nm on Multiskan EX 355 (Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA) spectrophotometer, after 24 h incubation time at 30 °C. Absorbance values lower than 20% of the bacterial growth controls were considered as MIC₈₀. Treatments were carried out with three technical replicates in five independent experiments.

2.5. Total Antioxidant Capacity (TAC) Assays

2.5.1. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Assay

The ORAC test was executed according to the method of Kőszegi et al. without modifications [31]. The method is based on fluorescence quenching of Na₂-fluorescein oxidized by AAPH. The quenching is delayed by the antioxidants present in the standards/samples. Serial dilutions of Trolox were used as standard. Briefly, into each well of normal 96-well plates 150 µL of working fluorescein solution (400 nM dissolved in 75 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5) and 25 µL of blank/standard/plant extract (aqueous/ethanolic) were pipetted and the plates were preincubated for 30 min at 37 °C in the dark. After automated injection of 25 µL of AAPH solution (400 mM dissolved in 75 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5) the fluorescence intensities were measured in kinetic mode for 80 min at 37 °C, with excitation and emission wavelengths of 490 and 520 nm, respectively. For the fluorescence measurements, the plate reader (BioTek Synergy HT, Winooski, Vermont, USA) was thermostated at 37 °C. Five independent experiments were done with three technical replicates for each treatment.

2.5.2. Enhanced Chemiluminescence (ECL) Assay

The enhanced chemiluminescence method was performed following our previously published study without modifications [31]. The technique is based on the development of enhanced chemiluminescence (ECL) of luminol in the presence of peroxidase (POD), H₂O₂ and 4-iodophenol enhancer. The increase of the ECL signal is delayed, depending on the antioxidant capacity of the samples. Briefly, 70 µL of ECL detection reagent (0.15 M boric acid/NaOH, pH 9.6, supplemented

with 0.45 mM luminol and 1.8 mM 4-iodophenol) and 200 μL POD enzyme solution (15 $\mu\text{U}/\text{mL}$) were premixed and kept on ice. Trolox dilutions were used as standard. Into each well of white optical 96-well plates 20 μL Trolox/blank/sample and 270 μL of POD-ECL reagent were added. The reaction was initiated by automated injection of 20 μL ice-cold H_2O_2 (1.5 mM, in 0.1% citric acid). The chemiluminescence signal was followed for 10 min, using a plate reader (Biotek Synergy HT) in kinetic analysis mode. Five independent experiments were done with three technical replicates for each treatment.

2.5.3. 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Assay

The method is based on the absorbance decrease of DPPH, which is a stable organic radical. The measurement was conducted following the protocol described elsewhere [32,33], with some modifications. Briefly, 50 μL of blank/standard/plant sample dilutions followed by 100 μL of 200 μM DPPH (dissolved in 96% ethanol) and 50 μL of acetate buffer (100 mM, pH 5.5) were pipetted into 96-well general microplates. The absorbance changes were measured at 517 nm by a Perkin Elmer EnSpire Multimode plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) after 60 min incubation in the dark, at room temperature. The results were compared to serial dilutions of Trolox standard solution. Five independent experiments were done with three technical replicates for each treatment.

2.5.4. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assay

The technique is based on the generation of ABTS radical cation ($\text{ABTS}\bullet^+$) through the reaction between ABTS and potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). The method of Re et al. and Stratil et al. was adapted for the TEAC test with slight modification [34,35]. $\text{ABTS}\bullet^+$ was produced by reaction of ABTS stock solution (7 mM of ABTS dissolved in distilled water) with 2.45 mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (final concentration) and diluted with PBS (pH 7.4) until the absorbance was 0.70 ± 0.005 at 734 nm. Then 20 μL aliquots of varying concentrations of the leaf extracts (50% ethanolic/aqueous) were allowed to react with 80 μL of $\text{ABTS}\bullet^+$ (7 mM) and the absorbance readings were recorded at 734 nm by the Perkin Elmer EnSpire Multimode plate reader after 20 min incubation in the dark, at room temperature. Trolox was used as standard. All measurements were carried out in five independent experiments with three technical replicates.

2.5.5. Calculation of Total Antioxidant Capacities (TAC)

For both the ORAC and ECL assays, the results were calculated as Trolox equivalents (TE). In the ORAC method the area under the fluorescence curve (AUC) of the blank was subtracted from that of the standard/sample (netAUC) and a calibration line was calculated for the netAUC of the Trolox standards. In the luminescence technique (ECL) the AUC of the emission curves vs. Trolox standards were used to calculate the calibration line. In both cases the samples' TE values were obtained from the calibration curves which were then multiplied by the dilution factor and expressed as μM TE concentration. Finally, TAC was referred to 1 g of initial dry material for each plant sample.

For the DPPH and TEAC assays, the radical scavenging activity was expressed as IC_{50} (the concentration of the plant extract in $\mu\text{g}/\text{mL}$, required to scavenge 50% of DPPH or ABTS reactions), calculated by a linear regression curve made from the scavenging activities vs. amount of extracts of the samples. This means that the lower the IC_{50} value of the sample is, the higher antioxidant activity it possesses.

Radical scavenging activity of the leaf extracts in % of the blank was obtained using the following formula:

$$\text{Radical scavenging activity (\% inhibition)} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

where A_0 is the absorbance of the blank and A_1 is the absorbance of the sample.

2.6. Cell Cultures

Mouse fibroblasts (3T3, ATCC: CRL-1658) were cultured in DMEM with high glucose (4500 mg/L), supplemented with 5% non-essential amino acids, 10% FBS, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL), while the human epidermal immortalized keratinocyte cell line (HaCaT) was kindly provided by the laboratory of Prof. Tamás Bíró (Department of Immunology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Hungary). HaCaT cells were cultured in DMEM with high glucose (4500 mg/L), supplemented with 10% FBS, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) in 75 cm² cell culture flasks at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. In both cases, after reaching 80% confluency, the cells were trypsinized and plated in 96-well/24-well/6-well sterile plastic plates.

2.7. Quantification of Intracellular ROS

Cellular oxidative stress due to the overproduction of reactive oxygen species (ROS) generated by AAPH was measured using the DCFH-DA and the DHR123 methods [36–38]. Trolox and quercetin were used as positive controls. The optimal conditions of DCFH-DA and DHR123 assays were as follows on 96-well culture plates: seeding density of 5×10^4 cells/mL, cell culture incubation time for overnight. After washing with PBS co-incubation in Hanks' (5.5 mM glucose) with 50 µM DCFH-DA or 10 µM DHR123 and plant extract/quercetin/Trolox on 3T3/HaCaT cell cultures for 1 h was performed. After removal of the treating medium and washing with PBS, 1 mM AAPH oxidant in Hanks' glucose was added. The fluorescence intensity was recorded for 60 min on the Biotek microplate reader at 490/520 nm exc/em wavelengths at 37 °C. The radical scavenging activity was expressed as IC₅₀ (the concentration of the plant sample (µg/mL), required to scavenge 50% of DCFH or DHR123 fluorescence), calculated by a linear regression analysis of the serial dilutions of the leaf extracts.

The radical scavenging activity was obtained using the following equation:

$$\text{Radical scavenging activity (\% inhibition)} = \left(\frac{\text{AUC}_0 - \text{AUC}_1}{\text{AUC}_0} \right) \times 100 \quad (2)$$

where AUC₀ is the area under curve values of the blank and AUC₁ is the area under curve values of the sample. Five independent experiments were done with four technical replicates for each treatment.

2.8. Plate Reader Cytotoxicity Test

A multiparametric viability assay with one-step extraction was carried out following our previously published study without modifications to investigate the potential toxicity of 50% (*v/v*) ethanolic and aqueous leaf extracts [28]. *A. vulneraria* in 500–2500 µg/mL concentrations (ethanolic extracts) and 4000–8000 µg/mL concentrations (aqueous extracts) were tested. *F. magellanica* and *F. triphylla* in 50–800 µg/mL concentrations (ethanolic extracts) and 120–1000 µg/mL concentrations (aqueous extracts) were examined. *L. nummularia* in 250–1500 µg/mL concentrations (ethanolic extracts) and 3000–7000 µg/mL concentrations (aqueous extracts) were investigated. The final concentration of the ethanolic solvent was restricted up to 1.5% *v/v* in the wells, which concentration does not affect the viability of the cells. Briefly, 3T3 and HaCaT cells were treated with various concentrations of the plant extracts for 24 h, after that ATP was measured from the cell lysates with the bioluminescence method. Nucleic acid content was analyzed with PI staining, while intracellular proteins were quantified after fluorescent derivatization with fluorescamine. All results were expressed as mean ± SD in percentage compared with data obtained for the controls (~100%). Five independent experiments were done with four technical replicates for each treatment and dose response curves were calculated from the measured data. The dose-response curves were obtained after DoseResp fitting by using the OriginLab Pro software (version 2016, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

2.9. Flow Cytometric Cytotoxicity Test

In the plate reader analysis, we could estimate the cytotoxicity in general, however, using flow cytometry it is possible to reveal the type of potential cell injury induced by the leaf extracts. For this sensitive method we used lower concentrations of the 50% (v/v) ethanolic extracts; *A. vulneraria* in 50, 100, 200 µg/mL, *F. magellanica* and *F. triphylla* in 2.5, 5, 10 µg/mL and *L. nummularia* in 10, 25, 50 µg/mL concentrations, which were presumably sub-cytotoxic based on the plate reader viability assay. Experiments were carried out in three technical replicates on a BD Canto II cytometer (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Apoptotic, necrotic and late apoptotic cells were measured using Annexin V and 7-aminoactinomycin D (7AAD) staining. Annexin V was conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or Pacific Blue (PB), 7AAD was measured on the PerCP channel. Annexin V single positivity marked the apoptotic cells, 7AAD labeled the necrotic cells, the double positive population meant the late apoptotic cells, while the double negative population was live. Since two labels were used in one sample, positivity was defined based on fluorescence minus one (FMO) controls—which were the single-stained ones. Compensation and analysis was carried out in FlowJo v.10 (FlowJo LLC., Ashland, OR, USA).

2.10. In Vitro “Wound Healing” Assay

The in vitro migration test was evaluated using culture inserts of 500 µm width (Ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany). Briefly, an insert with 2 wells was placed in 24-well sterile culture plates, and then keratinocytes and fibroblasts were seeded into the 2 wells of the culture insert. After cell attachment and production of a monolayer, the culture insert was removed, and cells were incubated for 24 h with different sub-cytotoxic doses of 50% (v/v) ethanolic extracts. *A. vulneraria* in 50, 100, 200 µg/mL concentrations, *F. magellanica* and *F. triphylla* in 2.5, 5, 10 µg/mL concentrations and *L. nummularia* in 10, 25, 50 µg/mL concentrations were investigated. PDGF-BB was used as positive control at 15 ng/mL concentration. Within the cell-free gap the cell migration was visualized at every 4 h for 24 h by time-lapse imaging in bright field, using phase-contrast microscopy (JuLi Stage Real-Time Cell History Recorder, NanoEnTek, Seoul, Korea). The gap was monitored at an objective magnification of 10×. The closure rate of the open cell-free area was determined by quantifying the micro photo density data obtained for every occasion from the very same loci with ImageJ 1.x processing software (<https://imagej.nih.gov/ij/>). The closure rate in % was calculated by the following formula:

$$\text{Closure rate(\%)} = \left(\frac{\text{Open area}_{0,h} - \text{Open area}_{x,h}}{\text{Open area}_{0,h}} \right) \times 100 \quad (3)$$

where “Open area_{0,h}” is the cell-free area at the beginning of the experiment while “Open area_{x,h}” is the still cell-free space at time points of imaging the samples. Finally, closure rate curves were constructed and the area under curve (AUC) for each treatment and cell line was calculated. The corresponding AUC data were averaged (±SD) and the summarized closure rates for the leaf extracts/PDGF were given in percentage (%) of the untreated controls. Three independent experiments were done with three technical replicates for each treatment.

2.11. Statistical Analyses

Where appropriate, data were expressed in % of the control samples, which were assumed to be ~100%. In the cytotoxicity plate reader assay correlation coefficients of each tested parameter were given for the dose-response curves. Statistical evaluation was carried out in the antioxidant assays using independent t-test, where the ethanolic and aqueous extracts were compared with each other, furthermore, in the migration assay using one-way ANOVA test, where the control and the sample data of one type of treatment were compared by SPSS software (IBM, SPSS Statistics, version 22, Armonk, NY, USA). In addition, principal component analysis (PCA) was also used to test the differences between the two types of extracts of four selected medicinal plants and four chemical

antioxidant assays. For PCA, `prcomp` function was used from the stats package within R (R Core Team 2019, version 3.6.1, Vienna, Austria). In all cases, the level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Qualitative Analysis of Phenolic Compounds in Plant Extracts with LC-DAD-ESI-MS/MS

Aqueous and 50% (*v/v*) ethanolic extracts of *A. vulnneraria*, *F. magellanica*, *F. triphylla* and *L. nummularia* were studied using LC-DAD-ESI-MS/MS methods, in order to characterize the constituents responsible for the biological actions. Eighty-two gallic acid derivatives, hydroxycinnamic acid derivatives and flavonoid glycosides were detected altogether in the samples; moreover, eight anthocyanins were described in *Fuchsia* samples. Compounds were tentatively characterized by comparing their chromatographic behaviors, UV spectra and mass spectrometric fragmentation patterns with data from the literature. In order to provide semi-quantitative results regarding the quantities of the constituents, their relative abundance (%) was calculated according to the summarized areas of all the compounds that were detected in the UV (280 nm) chromatogram of the sample. Results are presented in Tables 1 and 2, UV chromatograms (280 nm) of the extracts are shown in Supplementary Material (Figures S1–S8).

Flavonol glycosides prevailed in *A. vulnneraria* samples with compounds bearing the aglycone moieties kaempferol (e.g., compounds 23 and 25) and quercetin (e.g., 40), as well as methoxylated aglycone moieties isorhamnetin (e.g., 33) and rhamnocitrin (e.g., 77). In addition, the aqueous extract comprised diverse caffeoyl (e.g., 5, 8), coumaroyl (e.g., 7, 10) and feruloyl acid derivatives (e.g., 20, 22).

L. nummularia also contained flavonol glycosides in high amounts, however, the samples were dominated by the presence of myricetin glycosides (e.g., 43, 45, 68, 69) with myricetin 3-*O*-desoxyhexoside (49) as the main compound detected in both the aqueous and 50% (*v/v*) ethanolic extracts, and other aglycones were hardly found. For the aqueous samples, occurrence of coumaroyl (7, 14, 15) and feruloyl glucarate (18, 20, 22) isomers was characteristic.

Unusual quercetin galloyl hexosides (46, 50, 53) and a kaempferol galloyl hexoside (58) were detected in *Fuchsia* samples and primarily in *F. magellanica*. Even if anthocyanins were predominant, a peonidin dihexoside isomer (V) was present in each *Fuchsia* sample, while cyanidin dihexoside (II) was described only in *F. magellanica* extracts.

The compound analyses data are summarized in dendrograms for the ethanolic and aqueous leaf extracts separately in Figures S9 and S10 (Supplementary Material).

Table 1. Cont.

No.	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M–H] [–] (m/z)	Fragment ions (m/z)	Tentative Characterization ^a	Presence and Relative Abundance (%) of Compounds in the Leaf Extracts ^b								Ref.
						AvE ^c	AvW ^c	FmE ^c	FmW ^c	Ft E ^c	FtW ^c	LnE ^c	LnW ^c	
20	13.3	283sh, 312	385	209, 191	Feruloyl glucarate		0.7					3.0	10.2	[42]
21	13.5	265, 349	771	609, 462, 301, 299, 285, 284, 283, 179	Quercetin 3-O-hexosyl-desoxyhexosyl-7- O-hexoside	2.2	1.0							[44]
22	13.8	288sh, 312	385	271, 209, 191, 163, 146, 119	Feruloyl glucarate		3.0						2.3	[42]
23	13.9	265, 349	771	609, 446, 445, 285, 284, 283, 179	Kaempferol 3-O-hexosyl-hexosyl-7-O-hexoside	2.6	0.9							[44]
24	13.9	276	475, 453	-	n.i.					2.5				-
25	14.4	264, 351	755	593, 446, 284, 283	Kaempferol 3-O-hexosyl-desoxyhexosyl-7- O-hexoside	2.5	2.9							[45]
26	15.0	272	651	399, 325, 163	n.i.		1.9			2.9				-
27	15.2	256, 354	625	463, 462, 301, 299	Quercetin 3-O-hexosyl-7-O-hexoside	1.6	1.2							[45]
28	15.7	257, 352	595	462, 433, 301, 299, 271	Quercetin 3-O-pentosyl-7-O-hexoside	0.7	1.2							[41]
29	15.8	268	305	225, 147, 135	n.i.			0.8	0.5			0.9	1.3	-
30	16.2	265, 347	609	447, 446, 285, 283	Kaempferol 3-O-hexosyl-7-O-hexoside	1.7	0.5							[41]
31	16.4	278	449	357, 275	n.i.							1.5	0.9	-
32	16.5	288sh, 321	575	443, 267, 249, 193, 175	1,3-O-Diferuloylglycerol pentoside		0.7							[46]
33	16.6	254, 354	639	519, 477, 461, 315, 314, 313, 299, 151	Isorhamnetin 3-O-hexosyl-7-O-hexoside	4.6	1.4							[47]
34	17.2	268, 295sh	693	477, 345, 327, 315, 300, 207, 183, 165	n.i.					1.8				-

Table 1. Cont.

No.	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M–H] [–] (m/z)	Fragment ions (m/z)	Tentative Characterization ^a	Presence and Relative Abundance (%) of Compounds in the Leaf Extracts ^b								Ref.
						AvE ^c	AvW ^c	FmE ^c	FmW ^c	Ft E ^c	FtW ^c	LnE ^c	LnW ^c	
35	17.4	252, 269sh, 332	443	267, 249, 193, 175, 149, 134, 113	1,3- <i>O</i> -Diferuloylglycerol	5.1	4.4							[46]
36	17.5	252, 269sh, 352	963	801, 625	Flavonoid		0.6							[43]
37	18.0	260	197		n.i.					3.2				-
38	18.0	268, 350	639	319, 301, 283, 239, 213, 203, 197, 157, 142, 130, 116, 109	Flavonoid	6.2	6.5							[43]
39	18.1	276	521	337, 191, 163	Coumaroylquinic acid derivative						1.2	0.7		[39]
40	18.2	266, 350	625	463, 300, 271, 255, 243, 179	Quercetin 3- <i>O</i> -hexosyl-hexoside	2.9	2.5							[47]
41	19.2	274	387 (775)	169, 151, 124	Gallic acid derivative (dimer)			0.4	0.2					[46]
42	19.3	274	537	271, 211, 169, 151, 124	Gallic acid derivative			0.2	0.1					[46]
43	19.3	266, 357	625	479, 306	Myricetin 3- <i>O</i> -desoxyhexosyl-hexoside						2.3	1.5		[48]
44	19.3	266, 355	609	429, 285, 284, 255, 227	Kaempferol 3- <i>O</i> -hexosyl-hexoside	1.2	2.6							[41]
45	19.4	267, 357	479	316	Myricetin 3- <i>O</i> -hexoside						1.1	0.8		-
46	19.5	262, 355	615	463, 301, 300, 271, 169	Quercetin galloyl hexoside			0.4	0.4	1.8	1.0			[47]
47	19.6	264, 352	639	459, 315, 314, 257	Isorhamnetin 3- <i>O</i> -hexosyl-hexoside		1.9							[49]
48	19.8	266, 331	593	429, 284, 255, 227	Kaempferol 3- <i>O</i> -desoxyhexosyl-hexoside	2.7	1.7							[41]
49	20.2	260, 354	463	317, 316	Myricetin 3- <i>O</i> -desoxyhexoside						22.0	17.2		[50]
50	20.3	255, 293sh, 359	615	301	Quercetin galloyl hexoside			0.1	0.1					[47]

Table 1. Cont.

No.	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M–H] [–] (m/z)	Fragment ions (m/z)	Tentative Characterization ^a	Presence and Relative Abundance (%) of Compounds in the Leaf Extracts ^b								Ref.
						AvE ^c	AvW ^c	FmE ^c	FmW ^c	FtE ^c	FtW ^c	LnE ^c	LnW ^c	
68	22.0	264, 340	477	331, 317	Myricetin desoxyhexoside derivative							2.8	3.4	[53]
69	22.0	264, 340	447	331, 317	Myricetin derivative							2.5	1.0	[53]
70	22.3	266, 340	639	477, 459, 315, 314, 267	Isorhamnetin 3-O-hexosyl-hexoside	1.1	2.6							[52]
71	22.3	266, 347	417	285, 284, 255, 227	Kaempferol 3-O-pentoside			0.3	0.2					[41]
72	22.4	267, 328	727	551, 491, 415, 267, 249	Ferulic acid derivative	2.0								[54]
73	22.4		623	431, 371, 345, 317, 301, 299	n.i.							0.8	0.5	-
74	22.5	267, 328	727	551, 415, 267, 183	Ferulic acid derivative		1.4							[54]
75	22.8	255, 266sh, 334	447	314, 285, 271, 257, 243	Isorhamnetin 3-O-pentoside		1.3							[52]
76	22.9	266, 351	599	447, 301, 300, 179, 151	Quercetin 3-O-desoxyhexoside derivative					0.1	0.1			[47]
77	23.4	266, 348	623	443, 299, 298, 283, 271	Rhamnocitrin 3-O-dihexozid	3.8	3.2							[54]
78	23.7	268, 339	609	315, 314, 193	Isorhamnetin 3-O-pentosyl-hexoside	0.6	1.5							[52]
79	23.8	268, 329	799	623, 485, 397, 299, 298	n.i.	2.1	0.7							-
80	24.8		477	301, 267, 249, 227, 209, 183, 165, 113	Ellagic acid derivative		0.6							[51]
81	24.9	250, 370	531	301, 300	Quercetin derivative					0.1	0.5			[47]
82	24.9	266, 344	593	413, 299, 298, 283	Rhamnocitrin 3-O-hexosyl-pentoside	1.1	0.7							[54]

^a Compound numbers and retention times (t_R) refer to UV chromatograms shown in Supplementary Materials (Figures S1–S8). ^b Relative abundance: area% of the compound calculated from the summarized areas of all compounds detected in the UV (280 nm) chromatogram. ^c Abbreviations: AvE: *Anthyllis vulneraria* 50% (v/v) ethanolic extract, AvW: *Anthyllis vulneraria* aqueous extract, FmE: *Fuchsia magellanica* 50% (v/v) ethanolic extract, FmW: *Fuchsia magellanica* aqueous extract, FtE: *Fuchsia triphylla* ethanolic extract, FtW: *Fuchsia triphylla* aqueous extract, LnE: *Lysimachia nummularia* 50% (v/v) ethanolic extract, LnW: *Lysimachia nummularia* aqueous extract, n.i.: not identified.

Table 2. LC-MS/MS data and tentative characterization of anthocyanins from *Fuchsia magellanica* and *Fuchsia triphylla* leaf extracts.

No.	t_R (min)	$[M + H]^+$ (m/z)	Fragment Ions (m/z)	Tentative Characterization ^a	Presence and Relative Abundance (%) of Compounds in the Leaf Extracts ^b				Ref.
					FmE ^c	FmW ^c	FtE ^c	FtW ^c	
I	2.0	767	453, 153	Anthocyanin (n.i.)	1.1				-
II	2.7	611	449, 287	Cyanidin dihexoside	3.0	18.3			[55,56]
III	2.9	783	303	Anthocyanin (n.i.)			5.9		-
IV	9.1	625	463, 301	Peonidin dihexoside	15.7				[55,56]
V	10.3	625	463, 301	Peonidin dihexoside	18.9	39.9	5.3	5.4	[55,56]
VI	10.7	487	325, 185	Anthocyanidin hexoside		4.2			-
VII	11.4	441	249	Anthocyanin (n.i.)				9.6	-
VIII	11.8	411	249	Anthocyanin (n.i.)			6.1	9.6	-

^a Compound numbers and retention times (t_R) refer to UV chromatograms shown in Supplementary Materials (Figures S3–S6). ^b Relative abundance: area% of the compound calculated from the summarized areas of all compounds detected in the UV (280 nm) chromatogram. ^c Abbreviations: FmE: *Fuchsia magellanica* 50% (v/v) ethanolic extract, FmW: *Fuchsia magellanica* aqueous extract, FtE: *Fuchsia triphylla* 50% (v/v) ethanolic extract, FtW: *Fuchsia triphylla* aqueous extract.

3.2. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC₈₀)

The effects of leaf extracts on Gram-positive and Gram-negative bacteria were determined by CLSI M07-A9 (Vol. 32, No. 2) guidelines (Table 3). For this study, Minimum Inhibitory Concentration (MIC₈₀) values under 100 µg/mL were considered to indicate good antimicrobial activity; from 500 to 100 µg/mL to show moderate antimicrobial activity; from 1000 to 500 µg/mL to point to weak antimicrobial activity; and over 1000 µg/mL to indicate inactivity.

The ethanolic extracts of *Fuchsia* species were considered to have good antibacterial activities (MIC₈₀ values were between 5 and 60 µg/mL concentrations) on *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. pyogenes* and *P. aeruginosa*, compared with erythromycin, where the MIC₈₀ values were between 0.1–42 µg/mL concentrations. Ethanolic extracts of *A. vulneraria* and *L. nummularia* showed moderate antimicrobial activity on *B. subtilis* and *S. pyogenes*, and *A. vulneraria* pointed to weak antimicrobial activity on *S. aureus*.

Interestingly, only the aqueous extracts of *Fuchsia* spp. of the tested plants indicated a remarkably good influence on *S. aureus*, *B. subtilis* and *S. pyogenes* (MIC₈₀ values between 17 and 65 µg/mL concentrations). The plant extracts did not have an antibacterial effect on *E. coli*.

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC₈₀) of selected medicinal plant extracts on *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* and *S. pyogenes*.

Test Bacteria	Treatment	MIC ₈₀ (µg/mL)	
		Ethanolic Extracts	Aqueous Extracts
<i>Escherichia coli</i>	erythromycin	30.56–42.88	
	<i>A. vulneraria</i>	N.D.	N.D.
	<i>F. magellanica</i>	N.D.	N.D.
	<i>F. triphylla</i>	N.D.	N.D.
	<i>L. nummularia</i>	N.D.	N.D.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	erythromycin	69.91–82.76	
	<i>A. vulneraria</i>	N.D.	N.D.
	<i>F. magellanica</i>	55.03–58.91	N.D.
	<i>F. triphylla</i>	49.03–58.87	N.D.
	<i>L. nummularia</i>	N.D.	N.D.
<i>Staphylococcus aureus</i>	erythromycin	0.09–0.25	
	<i>A. vulneraria</i>	715.90–835.92	N.D.
	<i>F. magellanica</i>	4.81–7.65	17.13–25.03
	<i>F. triphylla</i>	5.32–6.73	30.24–36.99
	<i>L. nummularia</i>	1063.75–1181.29	N.D.
<i>Bacillus subtilis</i>	erythromycin	0.10–0.18	
	<i>A. vulneraria</i>	288.02–313.01	N.D.
	<i>F. magellanica</i>	13.91–15.72	52.73–65.03
	<i>F. triphylla</i>	14.55–22.66	33.16–45.33
	<i>L. nummularia</i>	160.90–164.28	N.D.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	erythromycin	0.08–0.09	
	<i>A. vulneraria</i>	220.06–236.30	N.D.
	<i>F. magellanica</i>	11.83–14.99	41.72–44.91
	<i>F. triphylla</i>	11.61–17.92	41.95–43.23
	<i>L. nummularia</i>	179.43–203.56	N.D.

Five independent experiments, each in three replicates, compared with erythromycin as positive control. N.D.: not detected.

3.3. Total Antioxidant Capacity (TAC) Assays

The antioxidant properties of ethanolic and aqueous extracts of the investigated plants were evaluated by conventional chemical assays such as DPPH, TEAC, ORAC, and ECL methods (Figure 1). The lowest IC₅₀ values indicate the highest antioxidant effect with DPPH and TEAC scavenging activity tests, while the highest TE/g values mean the strongest antioxidant capacity in case of ORAC and

ECL assays. Generally, the ethanolic extracts showed higher antioxidant effect than aqueous extracts. Altogether, the ethanolic and aqueous extracts of *Fuchsia* species had the strongest antioxidant activity followed by *Lysimachia nummularia* and *Anthyllis vulneraria* in all methods.

The results of Principal Component Analysis (PCA) are shown in Figure 2. In the case of ethanolic extracts, a strong positive correlation was observed between the ORAC and ECL methods, while a moderate correlation existed between the data of TEAC and DPPH assays. These relationships were opposite to the results of aqueous extracts because of their stronger correlation between TEAC and DPPH methods than ECL and ORAC tests. The ethanolic extracts of *Fuchsia* species were more similar to each other than in the case of their aqueous extracts.

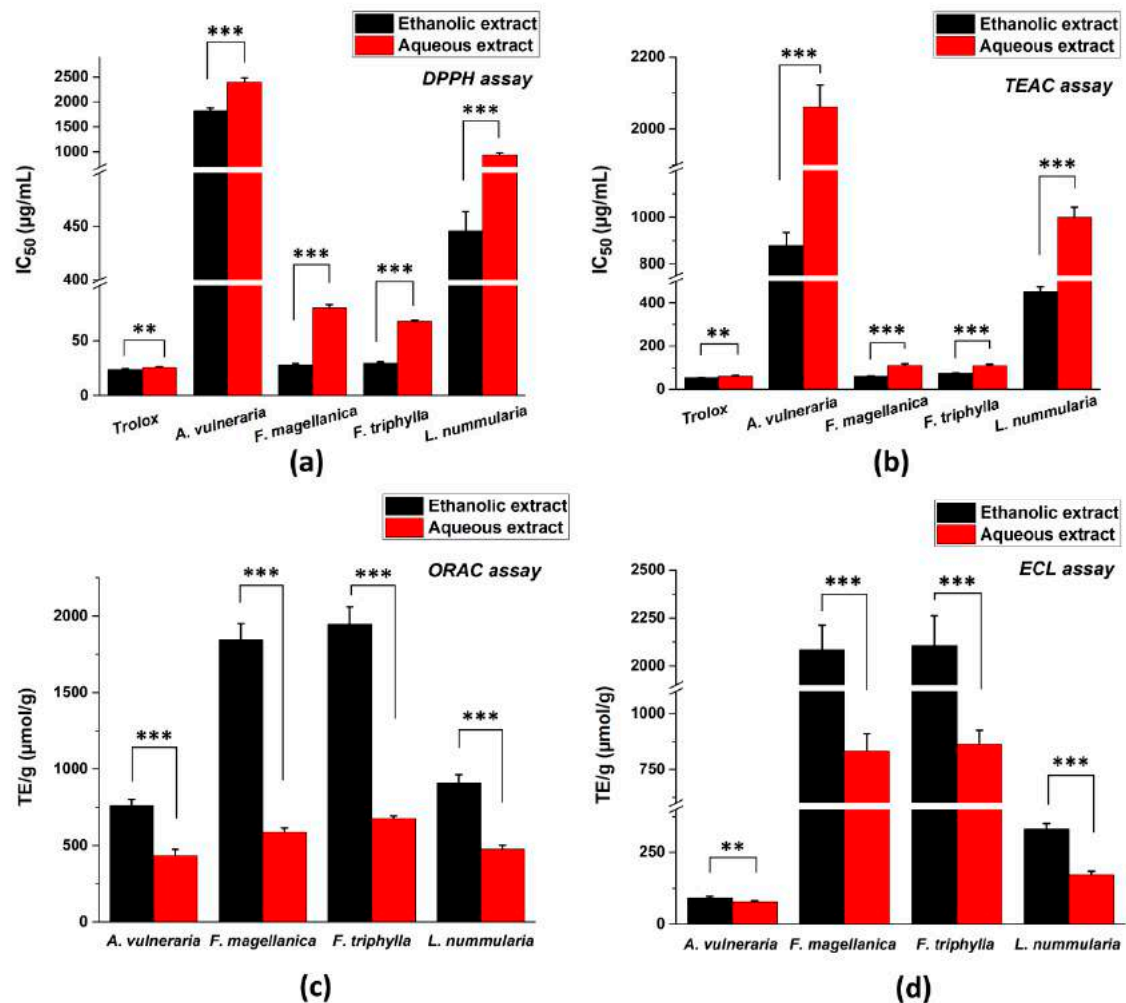


Figure 1. Total antioxidant capacity (TAC) of four selected medicinal plants measured by different spectroscopic methods: (a) DPPH assay; (b) TEAC assay; (c) ORAC assay and (d) ECL assay. IC_{50} values (in $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration at 50% inhibition) were calculated in case of DPPH and TEAC methods, while TE/g values (Trolox equivalent in μmol referred to 1 g of initial dry material) were determined in case of ORAC and ECL tests. Mean \pm SD of 5 independent experiments, each in 3 replicates. The aqueous and ethanolic extracts were compared with t-probe (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

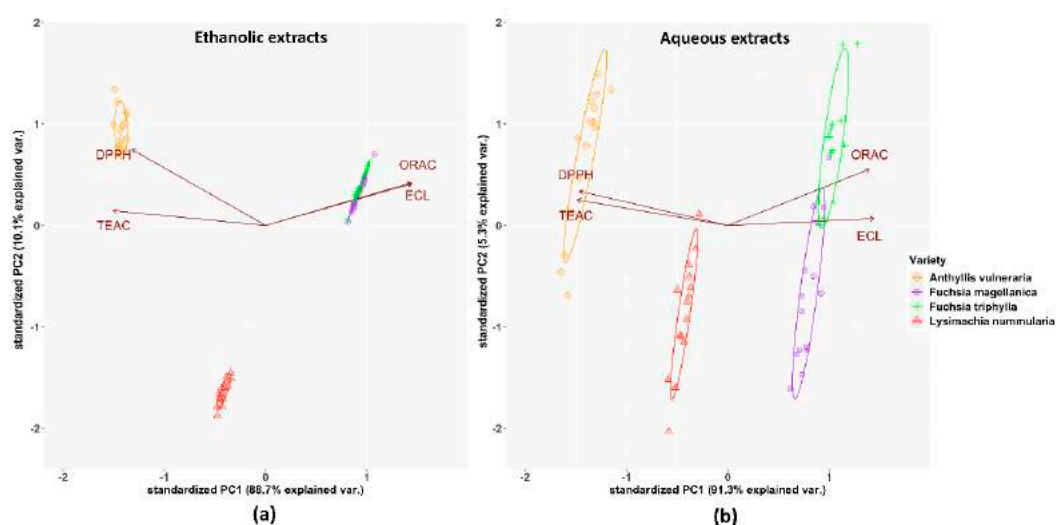


Figure 2. PCA analysis of the investigated plant species' total antioxidant capacity by four independent methods: (a) in the ethanolic extracts, (b) in the aqueous solutions, based on the antioxidant activities. % of total variance explained by each axis is provided within the figure. The symbols indicate 15 individual data for each plant extract.

3.4. Inhibition of Intracellular ROS Production

The oxidation of DCFH and DHR was generated by peroxy radicals from AAPH in 3T3 and in HaCaT cells [57]. The leaf extracts decreased the fluorescence of DCF and the calculated 50% inhibition values are shown in Figure 3. Ethanolic and aqueous extracts of *Fuchsia* species had the strongest inhibition in both cell lines, compared with other plant extracts. However, no antioxidant activity was detected for *A. vulneraria* in the case of 3T3 cells, and only ethanolic extracts of *A. vulneraria* showed measurable antioxidant property on HaCaT cell culture.

The generation of fluorescence signal from the rhodamine derivative was also decreased by the plant extracts and the calculated 50% inhibition values are shown in Figure 4. Both solvent fractions of *Fuchsia* spp. exerted the highest inhibition of the fluorescence intensity of rhodamine. Although ethanolic and aqueous extracts of *A. vulneraria* could be quantified, the aqueous fraction had only weak effectivity (at around the detection limit).

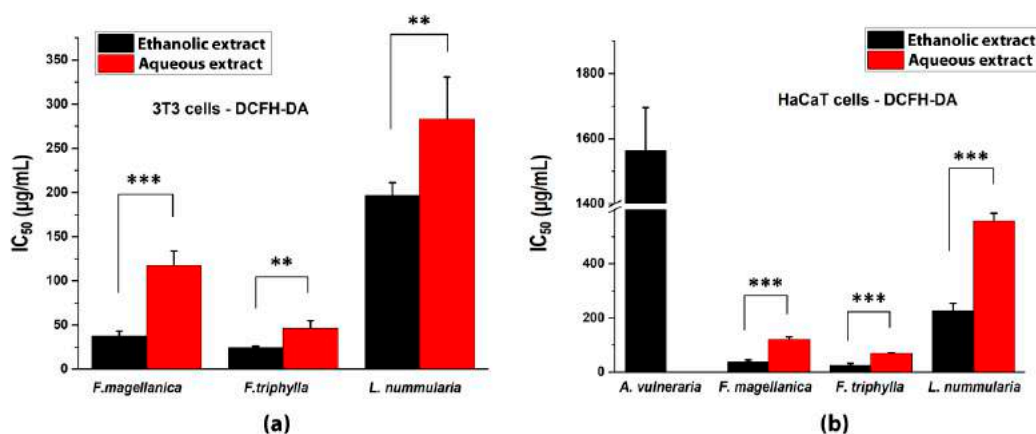


Figure 3. Intracellular antioxidant capacities of studied plant extracts with DCFH-DA staining (a) in 3T3 fibroblast cells and (b) in HaCaT keratinocyte cells. IC_{50} inhibitory concentrations were calculated from the equations obtained for the inhibitory capacities of the serial dilutions of the extracts. In the case of *A. vulneraria* the DCFH-DA scavenging activity data (when not shown) were at around/below the detection limit. Mean \pm SD of five independent experiments, $n = 5 \times 4$ replicates for each concentration. The aqueous and ethanolic extracts were compared with t-probe (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

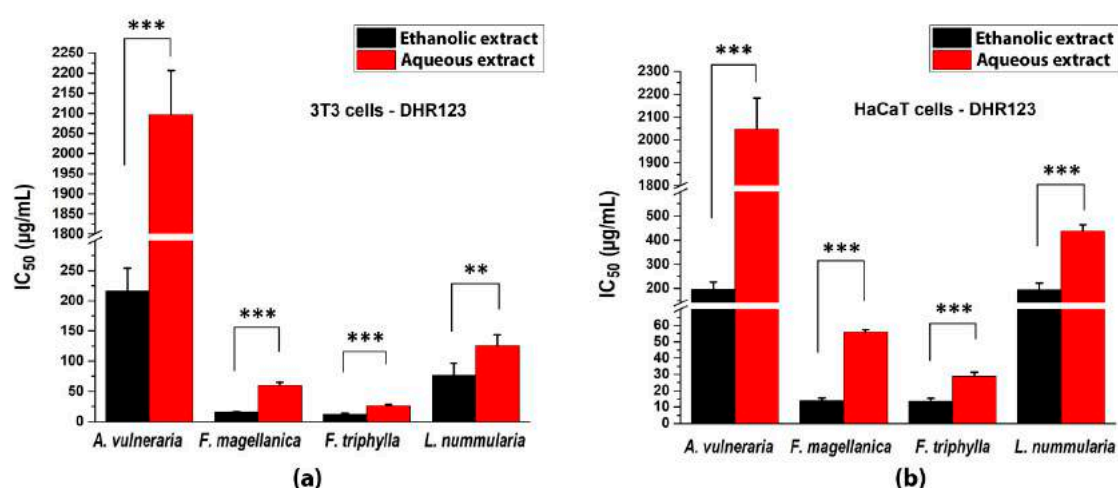


Figure 4. Intracellular antioxidant capacities of studied plant extracts with DHR123 (a) on 3T3 fibroblast cells and (b) on HaCaT cell culture. 50% inhibitory concentrations were calculated from the equations obtained for the inhibitory capacities of the serial dilutions of the extracts. Mean \pm SD of 5 independent experiments, $n = 5 \times 4$ replicates for each concentration. The aqueous and ethanolic extracts were compared with t-probe (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3.5. Plate Reader Cytotoxicity Tests

Cytotoxicity data obtained for fibroblast (3T3) and keratinocyte cell cultures (HaCaT) are seen in Figure 5. The ethanolic extracts reduced the ATP, cell number and protein contents of both cell lines in a dose dependent manner more effectively than the aqueous extracts. Nevertheless, these differences between the type of solvents were not observed in case of *Fuchsia* species. Both ethanolic and aqueous extracts of *Fuchsias* had the same toxic effects in the investigated cell lines. In 3T3 cells, the decrease of ATP, cell number and protein levels were more pronounced than in HaCaT cultures.

Evaluating the results of compound analyses, antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity data we decided to use only the ethanolic extracts in the further experiments because of their richer ingredient content and stronger biological effects. Potentially sub-toxic concentrations of the ethanolic extracts (*A. vulneraria* in 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$, *F. magellanica* and *F. triphylla* in 2.5, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ and *L. nummularia* in 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ concentrations) were used in all further investigations.

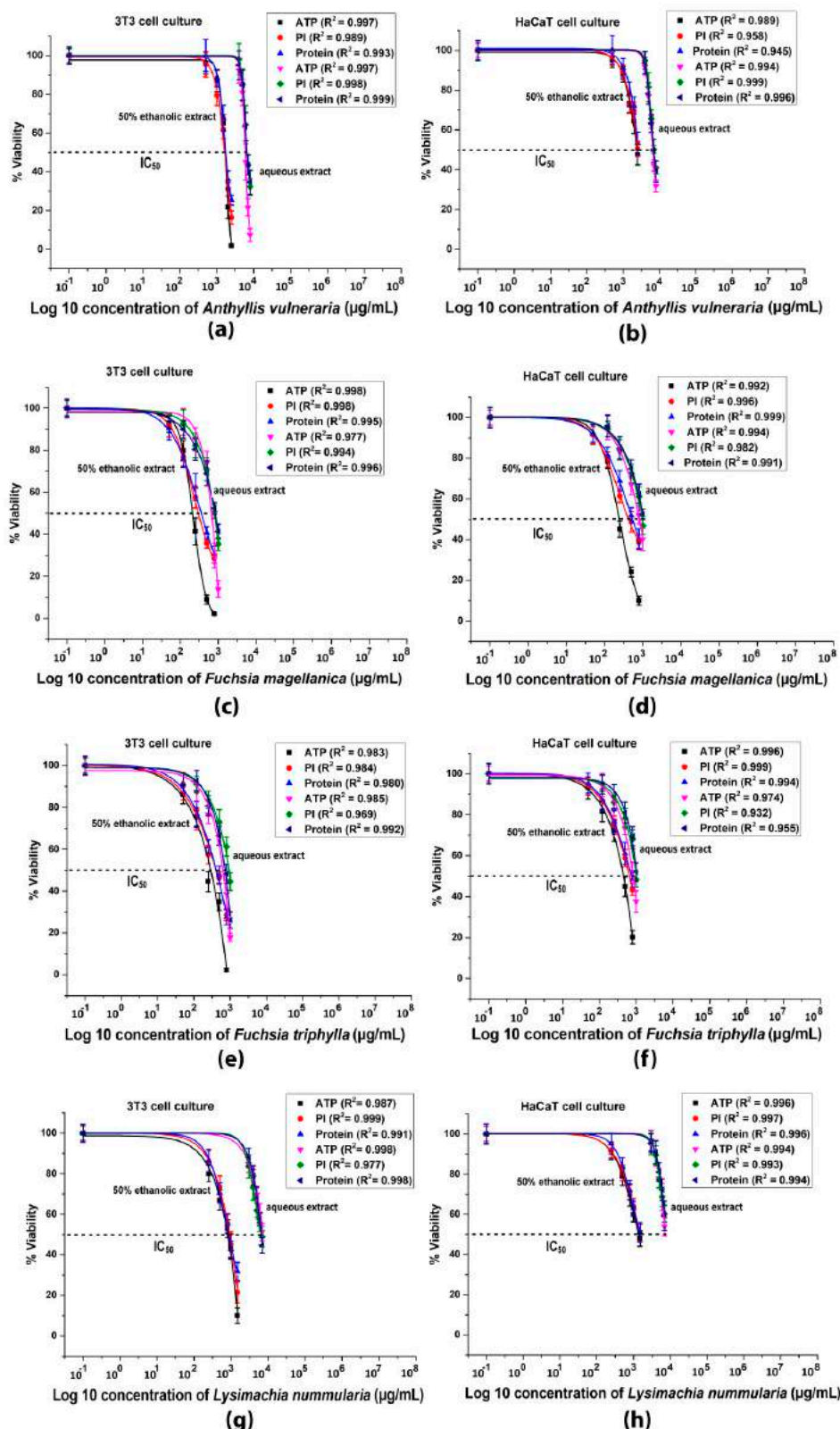


Figure 5. Intracellular ATP content, cell number (PI) and total protein levels of 3T3 and HaCaT cells with dose-response fitting: (a,b) cytotoxic effects of *A. vulnearia* on 3T3 and HaCaT cells; (c, d) cytotoxic effects of *F. magellanica* on 3T3 and HaCaT cells; (e,f) cytotoxic effects of *F. triphylla* on 3T3 and HaCaT cells; (g,h) cytotoxic effects of *L. nummularia* on 3T3 and HaCaT cells. Data are expressed in % of the control. Mean ± SD of 5 independent experiments, $n = 5 \times 8$ replicates for each concentration. Dose-response curves were created by log₁₀ transformation and nonlinear curve fitting. Correlation coefficients (R^2) were calculated for each treatment.

3.6. Flow Cytometric Cytotoxicity Test

Our apoptosis–necrosis results for the hypothesized nontoxic concentrations of ethanolic extracts are summarized for 3T3 cells in Table 4 and for HaCaT cells in Table 5. The two different cell lines gave similar results, namely the applied concentrations of the leaf extracts did not cause significant apoptosis/necrosis and most of the cells remained intact (the number of dead/dying cells was under 4% in both cell lines). An example of the gating strategy can be seen in the Supplementary Materials section (Figure S11).

Table 4. Apoptosis–necrosis assay data of 3T3 cells treated with 50% (*v/v*) ethanolic extracts of *A. vulneraria*, *F. magellanica*, *F. triphylla* and *L. nummularia* with Annexin V-7AAD flow cytometric method.

3T3 Cells				
Treatment Groups	Annexin V-7AAD Method			
	Live Cells (%)	Necrotic Cells (%)	Early Apoptotic Cells (%)	Late Apoptotic Cells (%)
Control cells	97.13	2.06	0.66	0.15
50 µg/mL <i>A. vulneraria</i>	96.29	2.46	1.00	0.25
100 µg/mL <i>A. vulneraria</i>	96.00	2.90	0.83	0.27
200 µg/mL <i>A. vulneraria</i>	96.89	2.22	0.70	0.20
2.5 µg/mL <i>F. magellanica</i>	96.95	2.03	0.75	0.26
5 µg/mL <i>F. magellanica</i>	96.27	2.67	0.79	0.27
10 µg/mL <i>F. magellanica</i>	96.62	2.25	0.78	0.34
2.5 µg/mL <i>F. triphylla</i>	97.74	1.26	0.84	0.17
5 µg/mL <i>F. triphylla</i>	98.15	1.01	0.71	0.13
10 µg/mL <i>F. triphylla</i>	97.57	1.50	0.62	0.30
10 µg/mL <i>L. nummularia</i>	95.63	2.98	1.05	0.33
25 µg/mL <i>L. nummularia</i>	95.33	3.31	1.07	0.29
50 µg/mL <i>L. nummularia</i>	95.48	2.81	1.34	0.38

Table 5. Apoptosis–necrosis assay data of HaCaT cells treated with 50% (*v/v*) ethanolic extracts of *A. vulneraria*, *F. magellanica*, *F. triphylla* and *L. nummularia* with Annexin V-7AAD flow cytometric method.

HaCaT Cells				
Treatment Groups	Annexin V-7AAD Method			
	Live Cells (%)	Necrotic Cells (%)	Early Apoptotic Cells (%)	Late Apoptotic Cells (%)
Control cells	99.04	1.31	0.49	0.47
50 µg/mL <i>A. vulneraria</i>	96.84	1.56	0.51	1.09
100 µg/mL <i>A. vulneraria</i>	95.29	3.36	0.51	0.83
200 µg/mL <i>A. vulneraria</i>	96.06	2.60	0.35	0.99
2.5 µg/mL <i>F. magellanica</i>	97.76	1.39	0.47	0.37
5 µg/mL <i>F. magellanica</i>	97.08	2.19	0.38	0.34
10 µg/mL <i>F. magellanica</i>	97.56	1.61	0.54	0.28
2.5 µg/mL <i>F. triphylla</i>	97.98	1.06	0.54	0.42
5 µg/mL <i>F. triphylla</i>	97.68	1.33	0.54	0.45
10 µg/mL <i>F. triphylla</i>	98.04	0.91	0.63	0.42
10 µg/mL <i>L. nummularia</i>	97.19	1.70	0.42	0.69
25 µg/mL <i>L. nummularia</i>	96.89	1.86	0.41	0.84
50 µg/mL <i>L. nummularia</i>	96.15	2.49	0.44	0.91

3.7. In vitro Migration Test

To investigate the impact of the ethanolic leaf extracts on the migration of fibroblasts and keratinocytes a standardized 500 μm cell-free area was created in 24-well culture plates by Teflon inserts. Figure 6 shows the effects of *A. vulneraria* and *L. nummularia* extracts while Figure 7 those of *F. magellanica* and *F. triphylla* on the migration of 3T3 and HaCaT cells.

The positive control PDGF-BB at 15 ng/mL concentration had a strong significant stimulating effect on cell migration ($117.05 \pm 6.72\%$ on 3T3 and $115.16 \pm 8.26\%$ on HaCaT cells), compared with untreated control cells. Of the tested four plants, *A. vulneraria* expressed a slight stimulatory effect ($107.01 \pm 7.35\%$ in 100 $\mu\text{g/mL}$ concentration and $104.54 \pm 8.86\%$ in 200 $\mu\text{g/mL}$ concentration) only on HaCaT cells, while enhanced migration and closure rate were observed in *F. magellanica* and *F. triphylla* treated cells when compared with untreated cells. Moreover, these extracts reached the response of the positive control, PDGF. Of the two *Fuchsia* species, *F. magellanica* had the strongest incentive effects on both cell lines, because the closure rate was $120.26 \pm 10.17\%$ on 3T3 cells and $114.61 \pm 3.72\%$ on HaCaT cells, respectively, in 2.5 $\mu\text{g/mL}$ concentration. *L. nummularia* did not show any significant migration effect towards the two cell lines.

On the other hand, it is noteworthy that the less concentrated leaf extracts produced the most efficient stimulation on cell migration when compared with extracts of higher concentrations.

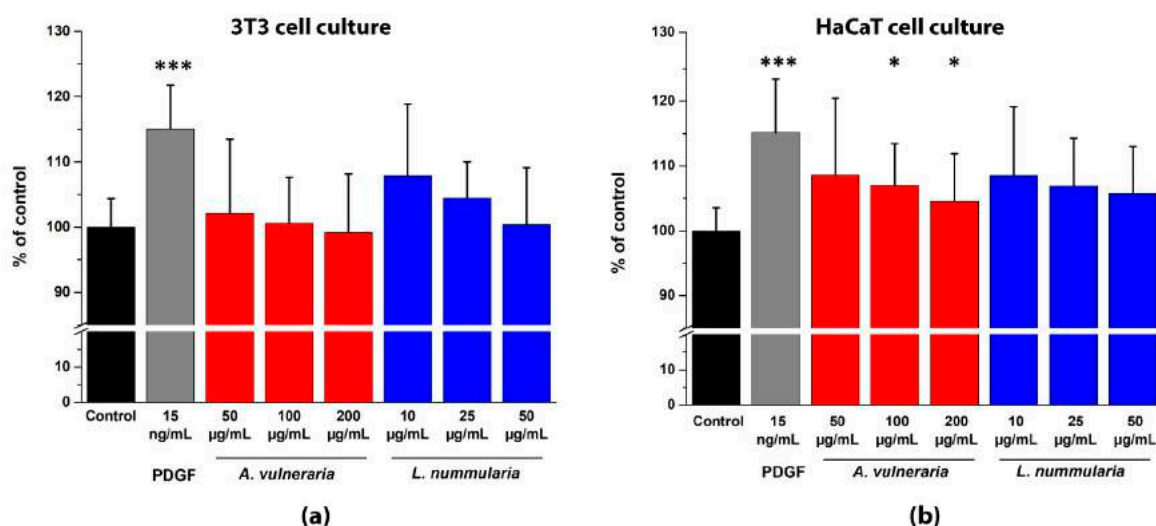


Figure 6. Comparative analysis by time-lapse imaging of wound closure ability of PDGF-BB and leaf extracts. (a) 50% (v/v) ethanolic extracts of *A. vulneraria* and *L. nummularia* on 3T3 monolayer cultures; (b) 50% (v/v) ethanolic extracts of *A. vulneraria* and *L. nummularia* on HaCaT monolayer cultures. Cells were monitored for 24 h in the absence and in the presence of plant extracts or PDGF with phase contrast microscopy. The bar graphs of AUC were calculated from cumulative closure rates (CR %) studied at every 4 h with three different concentrations from each plant. Mean \pm SD of three independent experiments. $n = 3 \times 3$ replicates. One-way Anova test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared with control).

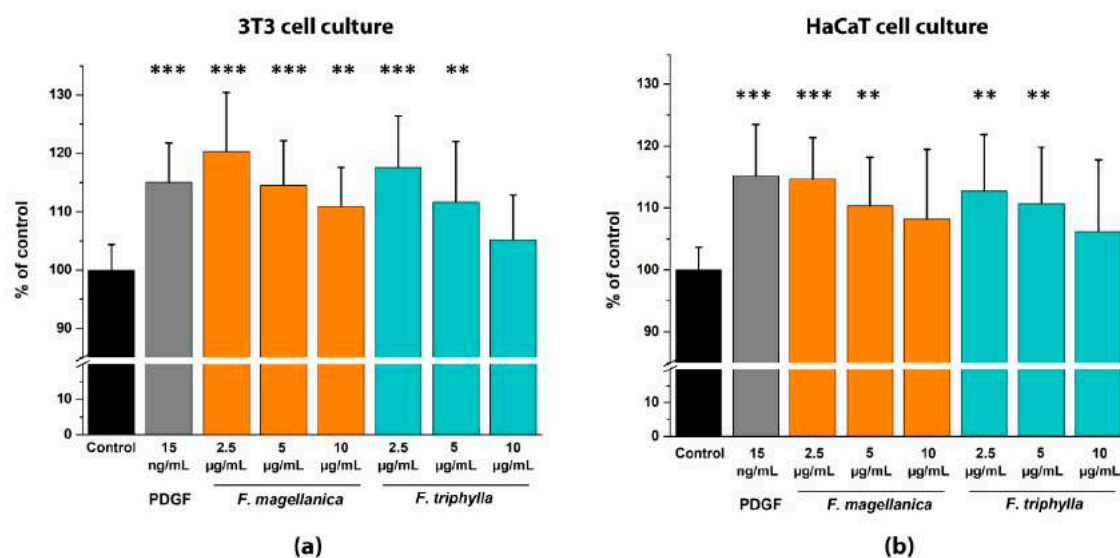


Figure 7. Comparative analysis by time-lapse imaging of wound closure ability of PDGF-BB and plant extracts on HaCaT monolayer. (a) 50% (*v/v*) ethanolic extracts of *F. magellanica* and *F. triphylla* on 3T3 monolayer cells; (b) 50% (*v/v*) ethanolic extracts of *F. magellanica* and *F. triphylla* on HaCaT monolayer cultures. Cells were monitored for 24 h in the absence and in the presence of plant extracts or PDGF with phase contrast microscopy. The bar graphs of AUC were calculated from cumulative closure rates (CR %) studied at every 4 h with three different concentrations from each plant. Mean \pm SD of three independent experiments. $n = 3 \times 3$ replicates. One-way Anova test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control).

4. Discussion

Our investigated medicinal plants are used in Transylvanian folk medicine for the treatment of various skin diseases. Of the tested plants, we could not find scientific studies to evaluate their biological effects, especially on cell migration and proliferation. Although we have some preliminary results of antioxidant effects and phytochemical data of the extracts of *Anthyllis vulneraria* and *Fuchsia* species [58], to our best knowledge, the present study is the first to analyze the cytotoxicity and combined effects of the ethanolic extracts in a cellular migration model that mimics wound healing ability.

Bioactive agents of plants may have specific functions on wound healing properties, including antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory effects via migration, proliferation and pro-collagen stimulating actions and they can modulate one or more phases of the wound healing process. For instance, tannins and flavonoids have anti-inflammatory and antibiotic effects [59,60]. Flavonoids and phenolic acids are well-known antioxidant compounds, and the position and degree of hydroxylation are essential to their activity. In flavonoids, *O*-dihydroxy structure on the B ring, 2,3 double bond in conjugation with a 4-oxofunction on the C ring, the presence of a 3-hydroxyl group on C ring and C3- and C5-OH moieties in a combination with 4-oxofunction on the A and C rings are required for maximum radical scavenging potential [2,61]. In phenolic acids, the presence of a 3-hydroxyl structure (2,3-hydroxybenzoic acid, gallic acid, caffeic acid and caftaric acid) enhances the antioxidant effect [2,62]. Anthocyanins are strong antioxidant compounds and their scavenging activity corresponds with their structural characteristics as well, di-acylated forms possess higher antioxidant activity than the mono-acylated and non-acylated anthocyanins [63]. Sun et al. demonstrated that peonidin and cyanidin-based anthocyanins exert strong antioxidant properties. Furthermore, they verified, that acylated forms have high antibacterial effect [64]. On the other hand, anthocyanins from various berries have a strong anti-inflammatory effect via inhibition of IL-1 β , IL-6 and COX-2 gene expression. Moreover, these colorful compounds stimulate the wound healing with increasing the migration of fibroblasts and keratinocytes [65,66].

We found that in *A. vulneraria* the most abundant amount of flavonol compounds are in glycosidic or methoxylated forms with lower activities than the aglycones [2]. In contrast, *Fuchsia* species contained, besides common flavonol compounds, various cinnamic acid and benzoic acid derivatives such as caffeic acid, ellagic acid and gallic acid derivatives, kaempferol- and quercetin-galloyl-glycosides. Moreover, the leaves of *F. magellanica* and *F. triphylla* contained several anthocyanins, such as cyanidin and peonidin derivatives. In the leaf extracts of *L. nummularia*, the main flavonoids were myricetin derivatives, which have strong antibacterial effects; however, in spite of this observation we detected weaker activities, compared to the standard antibiotic control and also to *Fuchsia* species [67]. The main differences between the investigated plants are that *Fuchsia* species contain high amounts of anthocyanins and hydroxybenzoic acids, which are well-known antioxidants and antimicrobial constituents; moreover, it has been proved, that they have a stimulating effect on cell migration [2,24,67].

Nevertheless, there are some contradictions in the literature regarding cell proliferation and migration effects of phenolic compounds, which act through different signaling pathways to express their effect in various cell lines. The polyphenols of tea suppress the migration of proliferation abilities of tumor cells by inhibiting NF- κ B activation and quenching the expression of cyclin D1 [68]. The other compound carnosol inhibits the migration and tumor growth via ROS-dependent proteasome degradation of STAT3 in several breast cancer cell lines [69]. LaFoya et al. investigated that some flavonoids, including resveratrol, apigenin, chrysin, genistein, luteolin, and myricetin, significantly inhibited the endothelial cell migration and proliferation in a statistically significant manner with the moderation of Notch signaling, while quercetin did not regulate these processes [70]. Several studies demonstrated that phenolic acids, such as caffeic acid, coumaric acid and ferulic acid, which belong to hydroxycinnamic acids, have anti-proliferative and apoptotic effects on tumor cells [71–74]. On the other hand, the caffeic acid phenethyl ester can stimulate wound re-epithelization and enhance the proliferation of keratinocytes [75]. Ly et al. have proved that chlorogenic acid has migration and invasion stimulating effects on trophoblasts through an adenosine monophosphate-activated protein (AMP) kinase-dependent pathway, while not affecting cell proliferation [76]. However, the hydroxybenzoic acids, such as ellagic acid and gallic acid, increase the proliferation and migration of keratinocytes and fibroblasts in a dose-dependent manner [77].

During the past decades, a wide variety of analytical methods has been developed for the measurement of the total antioxidant capacity [78]. Several studies found good linear correlation between the total phenolic and/or flavonoid content and antioxidant capacities of plants. In agreement with other researchers, we found correlations between the TEAC and DPPH assay as well as for ORAC and ECL methods [31,79–81]. On the other hand, these differences between antioxidant methods can be explained by their chemical backgrounds. The underlying mechanism of ECL and ORAC assays is the hydrogen atom transfer (HAT), while TEAC and DPPH tests are based on single electron transfer (SET) reaction [81]. The assessment of total antioxidant capacity by cell-free chemical assays cannot completely reflect the behavior of the complex plant samples in vivo. Therefore, it is important to evaluate the effectiveness of antioxidants in more biologically relevant conditions, such as testing of the compounds in cell-based antioxidant assays [82]. The two used fluorogenic reporter molecules are sensitive to peroxy radicals with similar oxidative mechanisms, therefore, DHR and DCFH gave closely matching scavenging activities as was expected from literature data [57].

In wound healing assays it is important to differentiate between proliferation and migration because the cells are usually not synchronized. Therefore, some authors use mitomycin C DNA synthesis inhibitor pretreatment to follow the migration solely when extended (48 h) incubation time is applied because it is longer than the generation cycle of the cells [83]. In our tests, we did not apply this compound because our incubation time was only 24 h, and the proliferation ability is minimal within this short period. HaCaT cell culture is an immortalized human keratinocyte cell line, with a doubling time of approximately 24 h (36.2 ± 1.5 h in the early passages (2–8) and 24 ± 0.6 h in the late passages (12–16) [84], while 3T3 mouse fibroblast cells have a doubling rate of 20–26 h [85].

In our migration tests, nontoxic doses of each extract were applied, where the fibroblast and keratinocyte cells showed more than 90% cell viability by the plate reader assay, and the necrotic (dead) cells were under 4% in the flow cytometric assay. 3T3 fibroblast cell culture was more vulnerable to exposure of the leaf extracts than HaCaT keratinocytes. One possible explanation of the increased sensitivity to potentially cytotoxic plant compounds might be that fibroblasts with the epidermal phenotype are located in the dermis, while keratinocytes are mostly found in the basement membrane zone (epidermis); therefore they should be more resistant against external noxae [86]. Our phytochemical and biological data suggest that *Fuchsia* species exerted the highest positive effect on cell migration among the four tested plants.

The found antimicrobial IC₅₀ values of *Fuchsia* species were lower in the antibacterial assay than IC₅₀ cytotoxicity values found for the fibroblasts and keratinocytes. Therefore, one may conclude that *Fuchsia* species extracts may possess effective components for the formulation of new antibacterial and wound healing stimulatory agents.

In our planned further experiments, another powerful approach for the characterization of the mode of action of the test compounds (i.e., polyphenols mediating the pathways of wound healing via modulation of various biomarkers such as growth factors, matrix metalloproteinases and cytokines) could be the measurement of secreted factors from the supernatant or the analysis of intracellular signaling pathways by Western blot and molecular biological methods. These studies are inevitably necessary for identifying the impact of complex plant extracts in wound healing processes [87,88].

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-3921/9/2/166/s1>. Figure S1: HPLC-DAD chromatogram of *A. vulneraria* 50% (v/v) ethanolic extract, detection wavelength: 280 nm. Numbering of peaks refers to data shown in Table 1. Figure S2: HPLC-DAD chromatogram of *A. vulneraria* aqueous extract, detection wavelength: 280 nm. Numbering of peaks refers to data shown in Table 1. Figure S3: HPLC-DAD chromatogram of *F. magellanica* 50% (v/v) ethanolic extract, detection wavelength: 280 nm. Numbering of peaks refers to data shown in Tables 1 and 2. Figure S4: HPLC-DAD chromatogram of *F. magellanica* aqueous extract, detection wavelength: 280 nm. Numbering of peaks refers to data shown in Tables 1 and 2. Figure S5: HPLC-DAD chromatogram of *F. triphylla* 50% (v/v) ethanolic extract, detection wavelength: 280 nm. Numbering of peaks refers to data shown in Tables 1 and 2. Figure S6: HPLC-DAD chromatogram of *F. triphylla* aqueous extract, detection wavelength: 280 nm. Numbering of peaks refers to data shown in Tables 1 and 2. Figure S7: HPLC-DAD chromatogram of *L. nummularia* 50% (v/v) ethanolic extract, detection wavelength: 280 nm. Numbering of peaks refers to data shown in Table 1. Figure S8: HPLC-DAD chromatogram of *L. nummularia* aqueous extract, detection wavelength: 280 nm. Numbering of peaks refers to data shown in Table 1. Figure S9: Dendrogram of the summarized compound analysis data of 50% (v/v) ethanolic plant extracts. Figure S10: Dendrogram of the summarized compound analysis data of aqueous plant extracts. Figure S11: Gating strategy of the flow cytometry experiments.

Author Contributions: R.C., T.K. and V.T. conceived the study and wrote the paper. Á.A. and C.A.T. performed and evaluated the HPLC investigations. R.C. performed the antioxidant assays and analyzed the data. R.C. and S.D. performed the antimicrobial tests. R.H. performed the statistical analyses. R.C. and V.T. carried out the cellular experiments including the migration assays. N.P. collected the samples, performed the identification of the species and description of the habitats. N.P. and T.K. provided financial resources. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a grant from the NKFIH (Hungarian Scientific Research Fund. K 127944); KA-2018-17 grant from University of Pécs, Medical School; EFOP 3.6.1-16-2016-00004 project (Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs); and Higher Education Institutional Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology in Hungary, within the framework of the second thematic program of the University of Pécs (FIKP II.2.).

Acknowledgments: We would like to thank the Bioinformatics Research Group at Szentágotthai Research Center for their help in the statistical analyses. We also express our gratitude to Noémi Miltner, who gave us invaluable contributions in order to get the keratinocyte cell line.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Patay, E.B.; Sali, N.; Koszegi, T.; Csepregi, R.; Balazs, V.L.; Nemeth, T.S.; Nemeth, T.; Papp, N. Antioxidant potential, tannin and polyphenol contents of seed and pericarp of three *Coffea* species. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2016**, *9*, 366–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Csepregi, K.; Neugart, S.; Schreiner, M.; Hideg, E. Comparative Evaluation of Total Antioxidant Capacities of Plant Polyphenols. *Molecules* **2016**, *21*, 208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Maqsood, S.; Benjakul, S. Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. *Food Chem.* **2010**, *119*, 123–132. [[CrossRef](#)]
4. Tutin, T.; Heywood, V.; Burges, N.; Moore, D.; Valentine, D.; Walters, S.; Webb, D. *Flora Europaea*, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2010.
5. Szabó, L.G. *Medicinal Plants*; Schmidt und Co. Ltd. Melius Foundation: Baksa-Pecs, Hungary, 2005. (In Hungarian)
6. Butura, V. *Ethnobotanical Encyclopaedia of Romania*; Editura Științifică și Enciclopedică: Bucharest, Romania, 1979. (In Hungarian)
7. Borza, A. *Dictionary of Ethnobotany*; Editura Academiei Republicii Socialiste Romania: Bucharest, Romania, 1968. (In Romanian)
8. Makay, B. *Handbook of Healing with Plants*; Felső-Magyarországi Kiadó: Nyíregyháza, Hungary, 1994. (In Hungarian)
9. Péntek, J.; Szabó, T.A. *People and Plants. Ethnobotanical Knowledge of Rural People in Tara Călatei*; Kriterion Publ. House: Bucharest, Romania, 1985. (In Hungarian)
10. Gonnett, J.-F.; Jay, M. Les aglycones flavoniques d’*Anthyllis vulneraria*. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 2313–2316. [[CrossRef](#)]
11. Nartowska, J.; Wawer, I.; Strzelecka, H. Triterpenoid saponin from *Anthyllis vulneraria* L. *Acta Pol. Pharm.* **2001**, *58*, 289–291.
12. Ghalem, M.; Merghache, S.; Ghalem, S.; Belarbi, M. Phenolic contents and in vitro antioxidant activity of some secondary metabolites of *Anthyllis vulneraria* L. from Algeria. *Int. J. Med. Pharm. Sci.* **2012**, *2*, 51–64.
13. Halász, P. *Plants in the Everyday Life and Traditions of Moldovan Hungarians*; General Press: Budapest, Hungary, 2010. (In Hungarian)
14. Papp, N.; Horváth, D. *Traditions and Ethnomedicine in Crăciunel*; Homoródkarácsonyfalvi Közbirtokosság: Homoródkarácsonyfalva, Romania, 2016. (In Hungarian)
15. Rácz, G.; Füzi, J. *Medicinal Plants in Covasna County*; Directorate of Agriculture and Food Industry: Sepsiszentgyörgy, Romania, 1973. (In Hungarian)
16. Gub, J. Ethnobotanical Data along the Nagy-Homoród. In *Plants in the Folklore*; Zsigmond, G., Ed.; Magyar Köztársaság Kulturális Intézete: Bucharest, Romania, 2005. (In Hungarian)
17. Papp, N. *Traditions and Ethnomedicine in Lueta*; Lövétei Közbirtokossága és Polgármestei Hivatal: Lövete, Romania, 2018. (In Hungarian)
18. Toth, A.; Toth, G.; Kery, A. Polyphenol composition and antioxidant capacity of three *Lysimachia* species. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9*, 1473–1478. [[CrossRef](#)]
19. Podolak, I.; Koczurkiewicz, P.; Galanty, A.; Michalik, M. Cytotoxic triterpene saponins from the underground parts of six *Lysimachia* L. species. *Biochem. Syst. Ecol.* **2013**, *47*, 116–120. [[CrossRef](#)]
20. Boris, G. *Ethnobotanical Use of Medicinal Plants in Lueta*. Bachelor’s Thesis, University of Pécs, Pécs, Hungary, 2010. (In Hungarian).
21. Crowden, R.K.; Wright, J.; Harborne, J.B. Anthocyanins of *Fuchsia* (Onagraceae). *Phytochemistry* **1977**, *16*, 400–402. [[CrossRef](#)]
22. Ruiz, A.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Vergara, C.; Baer, D.; Zapata, M.; Hirschfeld, A.; Obando, L.; Mardones, C. Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Res. Int.* **2013**, *51*, 706–713. [[CrossRef](#)]
23. Williams, C.A.; Garnock-Jones, P.J. Leaf flavonoids and other phenolic glycosides and the taxonomy and phylogeny of *Fuchsia* sect. *skinnera* (Onagraceae). *Phytochemistry* **1986**, *25*, 2547–2549. [[CrossRef](#)]
24. Ghosh, P.K.; Gaba, A. Phyto-extracts in wound healing. *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Soc. Can. Sci. Pharm.* **2013**, *16*, 760–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Adetutu, A.; Morgan, W.A.; Corcoran, O. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation activity of crude extracts of *Bridelia ferruginea* leaf, a wound-healing plant of Nigeria. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *133*, 116–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Süntar, I.; Akkol, E.K.; Nahar, L.; Sarker, S.D. Wound healing and antioxidant properties: Do they coexist in plants? *Free Radic. Antioxid.* **2012**, *2*, 1–7. [[CrossRef](#)]
27. Behm, B.; Babilas, P.; Landthaler, M.; Schreml, S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* **2012**, *26*, 812–820. [[CrossRef](#)]
28. Csepregi, R.; Temesfoi, V.; Poor, M.; Faust, Z.; Koszegi, T. Green Fluorescent Protein-Based Viability Assay in a Multiparametric Configuration. *Molecules* **2018**, *23*, 1575. [[CrossRef](#)]
29. Lee, J.H.; Cho, S.; Paik, H.D.; Choi, C.W.; Nam, K.T.; Hwang, S.G.; Kim, S.K. Investigation on antibacterial and antioxidant activities, phenolic and flavonoid contents of some thai edible plants as an alternative for antibiotics. *Asian-Australas. J. Anim.* **2014**, *27*, 1461–1468. [[CrossRef](#)]
30. Das, S.; Gazdag, Z.; Szente, L.; Meggyes, M.; Horvath, G.; Lemli, B.; Kunsagi-Mate, S.; Kuzma, M.; Koszegi, T. Antioxidant and antimicrobial properties of randomly methylated beta cyclodextrin-captured essential oils. *Food Chem.* **2019**, *278*, 305–313. [[CrossRef](#)]
31. Koszegi, T.; Sali, N.; Raknic, M.; Horvath-Szalai, Z.; Csepregi, R.; Koncic, M.Z.; Papp, N.; Poor, M. A novel luminol-based enhanced chemiluminescence antioxidant capacity microplate assay for use in different biological matrices. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2017**, *88*, 153–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bertonecelj, J.; Doberšek, U.; Jamnik, M.; Golob, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem.* **2007**, *105*, 822–828. [[CrossRef](#)]
33. Beretta, G.; Granata, P.; Ferrero, M.; Orioli, M.; Facino, R.M. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *533*, 185–191. [[CrossRef](#)]
34. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
35. Stratil, P.; Klejdus, B.; Kuban, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta* **2007**, *71*, 1741–1751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wan, H.; Liu, D.; Yu, X.; Sun, H.; Li, Y. A Caco-2 cell-based quantitative antioxidant activity assay for antioxidants. *Food Chem.* **2015**, *175*, 601–608. [[CrossRef](#)]
37. Balaiya, S.; Chalam, K.V. An In vitro Assay to Quantify Nitrosative Component of Oxidative Stress. *J. Mol. Genet. Med. Int. J. Biomed. Res.* **2014**, *8*. [[CrossRef](#)]
38. Kalyanaraman, B.; Darley-Usmar, V.; Davies, K.J.; Dennery, P.A.; Forman, H.J.; Grisham, M.B.; Mann, G.E.; Moore, K.; Roberts, L.J., 2nd; Ischiropoulos, H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52*, 1–6. [[CrossRef](#)]
39. Clifford, M.N.; Johnston, K.L.; Knight, S.; Kuhnert, N. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2900–2911. [[CrossRef](#)]
40. Said, R.B.; Hamed, A.I.; Mahalel, U.A.; Al-Ayed, A.S.; Kowalczyk, M.; Moldoch, J.; Oleszek, W.; Stochmal, A. Tentative Characterization of Polyphenolic Compounds in the Male Flowers of *Phoenix dactylifera* by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry and DFT. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 512. [[CrossRef](#)]
41. Alberti, A.; Beni, S.; Lacko, E.; Riba, P.; Al-Khrasani, M.; Kery, A. Characterization of phenolic compounds and antinociceptive activity of *Sempervivum tectorum* L. leaf juice. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *70*, 143–150. [[CrossRef](#)]
42. Lorenz, P.; Conrad, J.; Bertrams, J.; Berger, M.; Duckstein, S.; Meyer, U.; Stintzing, F.C. Investigations into the Phenolic Constituents of Dog's Mercury (*Mercurialis perennis* L.) by LC-MS/MS and GC-MS analyses. *Phytochem. Anal.* **2012**, *23*, 60–71. [[CrossRef](#)]
43. Abad-García, B.; Berrueta, L.A.; Garmón-Lobato, S.; Gallo, B.; Vicente, F. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode-array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 5398–5415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Rösch, D.; Krumbein, A.; Mügge, C.; Kroh, L.W. Structural Investigations of Flavonol Glycosides from Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Pomace by NMR Spectroscopy and HPLC-ESI-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4039–4046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Simirgiotis, M.J.; Schmeda-Hirschmann, G. Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 443–449. [[CrossRef](#)]
46. Kang, J.; Price, W.E.; Ashton, J.; Tapsell, L.C.; Johnson, S. Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MS. *Food Chem.* **2016**, *211*, 215–226. [[CrossRef](#)]
47. Chen, Y.; Yu, H.; Wu, H.; Pan, Y.; Wang, K.; Jin, Y.; Zhang, C. Characterization and Quantification by LC-MS/MS of the Chemical Components of the Heating Products of the Flavonoids Extract in Pollen Typhae for Transformation Rule Exploration. *Molecules* **2015**, *20*, 18352–18366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Tóth, A.; Riethmüller, E.; Alberti, Á.; Vég, K.; Kéry, Á. Comparative Phytochemical Screening of Phenoloids in *Lysimachia* Species. *Eur. Chem. Bull.* **2012**, *1*, 27–30.
49. Lin, L.Z.; Harnly, J.M. Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Chem.* **2010**, *120*, 319–326. [[CrossRef](#)]
50. de Brito, E.S.; de Araujo, M.C.; Lin, L.Z.; Harnly, J. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. *Food Chem.* **2007**, *105*, 1112–1118. [[CrossRef](#)]
51. Kumar, S.; Singh, A.; Kumar, B. Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of *Phyllanthus* species by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *J. Pharm. Anal.* **2017**, *7*, 214–222. [[CrossRef](#)]
52. Mena, P.; Cirlini, M.; Tassotti, M.; Herrlinger, K.A.; Dall'Asta, C.; Del Rio, D. Phytochemical Profiling of Flavonoids, Phenolic Acids, Terpenoids, and Volatile Fraction of a Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract. *Molecules* **2016**, *21*, 1576. [[CrossRef](#)]
53. Bouaoudia-Madi, N.; Boulekbache-Makhlouf, L.; Madani, K.; Silva, A.M.S.; Dairi, S.; Oukhmanou-Bensidhoum, S.; Cardoso, S.M. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenols from *Myrtus communis* L. Pericarp. *Antioxidants* **2019**, *8*, 205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Li, Y.; Wang, C.; Li, H.; Yu, T.; Tan, L. Simultaneous Determination of Formononetin, Calycosin and Rhamnocitrin from *Astragalus Complanatus* by UHPLC-MS-MS in Rat Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study. *J. Chromatogr. Sci.* **2016**, *54*, 1605–1612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Wu, X.; Prior, R.L. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: Vegetables, nuts, and grains. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3101–3113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Mazzuca, P.; Ferranti, P.; Picariello, G.; Chianese, L.; Addeo, F. Mass spectrometry in the study of anthocyanins and their derivatives: Differentiation of *Vitis vinifera* and hybrid grapes by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* *JMS* **2005**, *40*, 83–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Pavelescu, L.A. On reactive oxygen species measurement in living systems. *J. Med. Life* **2015**, *8*, 38–42. [[PubMed](#)]
58. Csepregi, R.; Bencsik, T.; Papp, N. Examination of secondary metabolites and antioxidant capacity of *Anthyllis vulneraria*, *Fuchsia* sp., *Galium mollugo* and *Veronica beccabunga*. *Acta Biol. Hung.* **2016**, *67*, 442–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Ibrahim, N.; Wong, S.K.; Mohamed, I.N.; Mohamed, N.; Chin, K.Y.; Ima-Nirwana, S.; Shuid, A.N. Wound Healing Properties of Selected Natural Products. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2018**, *15*, 2360. [[CrossRef](#)]
60. Harborne, J.B. *Phytochemical Methods*; Fakenham Press Limited: New York, NY, USA, 1973. [[CrossRef](#)]
61. Dai, J.; Mumper, J.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **2010**, *15*, 7313–7352. [[CrossRef](#)]
62. Rahman, M.M.; Ichyanagi, T.; Komiyama, T.; Hatano, Y.; Konishi, T. Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. *Free Radic. Res.* **2006**, *40*, 993–1002. [[CrossRef](#)]
63. Ali, H.M.; Almagribi, W.; Al-Rashidi, M.N. Antiradical and reductant activities of anthocyanidins and anthocyanins, structure-activity relationship and synthesis. *Food Chem.* **2016**, *194*, 1275–1282. [[CrossRef](#)]
64. Sun, X.H.; Zhou, T.T.; Wei, C.H.; Lan, W.Q.; Zhao, Y.; Pan, Y.J.; Wu, V.C.H. Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin rich Chinese wild blueberry extract on various foodborne pathogens. *Food Control* **2018**, *94*, 155–161. [[CrossRef](#)]

65. Van de Velde, F.; Esposito, D.; Grace, M.H.; Pirovani, M.E.; Lila, M.A. Anti-inflammatory and wound healing properties of polyphenolic extracts from strawberry and blackberry fruits. *Food Res. Int.* **2019**, *121*, 453–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Nizamutdinova, I.T.; Kim, Y.M.; Chung, J.I.; Shin, S.C.; Jeong, Y.K.; Seo, H.G.; Lee, J.H.; Chang, K.C.; Kim, H.J. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **2009**, *47*, 2806–2812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Xie, Y.; Chen, J.; Xiao, A.; Liu, L. Antibacterial Activity of Polyphenols: Structure-Activity Relationship and Influence of Hyperglycemic Condition. *Molecules* **2017**, *22*, 1913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Singh, M.; Bhatnagar, P.; Mishra, S.; Kumar, P.; Shukla, Y.; Gupta, K.C. PLGA-encapsulated tea polyphenols enhance the chemotherapeutic efficacy of cisplatin against human cancer cells and mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 6789–6809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Alsamri, H.; El Hasasna, H.; Al Dhaheri, Y.; Eid, A.H.; Attoub, S.; Iratni, R. Carnosol, a Natural Polyphenol, Inhibits Migration, Metastasis, and Tumor Growth of Breast Cancer via a ROS-Dependent Proteasome Degradation of STAT3. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 743. [[CrossRef](#)]
70. LaFoya, B.; Munroe, J.A.; Albig, A.R. A comparison of resveratrol and other polyphenolic compounds on Notch activation and endothelial cell activity. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0210607. [[CrossRef](#)]
71. Ye, J.C.; Hsiao, M.W.; Hsieh, C.H.; Wu, W.C.; Hung, Y.C.; Chang, W.C. Analysis of caffeic acid extraction from *Ocimum gratissimum* Linn. by high performance liquid chromatography and its effects on a cervical cancer cell line. *J. Obstet. Gynecol.* **2010**, *49*, 266–271. [[CrossRef](#)]
72. Sanderson, J.T.; Clabault, H.; Patton, C.; Lassalle-Claux, G.; Jean-Francois, J.; Pare, A.F.; Hebert, M.J.; Surette, M.E.; Touaibia, M. Antiproliferative, antiandrogenic and cytotoxic effects of novel caffeic acid derivatives in LNCaP human androgen-dependent prostate cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7182–7193. [[CrossRef](#)]
73. Nasr Bouzaiene, N.; Kilani Jaziri, S.; Kovacic, H.; Chekir-Ghedira, L.; Ghedira, K.; Luis, J. The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *766*, 99–105. [[CrossRef](#)]
74. Kampa, M.; Alexaki, V.I.; Notas, G.; Nifli, A.P.; Nistikaki, A.; Hatzoglou, A.; Bakogeorgou, E.; Kouimtzioglou, E.; Blekas, G.; Boskou, D.; et al. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: Potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res. BCR* **2004**, *6*, R63–R74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Brudzynski, K.; Carlone, R. Stage-dependent modulation of limb regeneration by caffeic acid phenethyl ester (CAPE)—immunocytochemical evidence of a CAPE-evoked delay in mesenchyme formation and limb regeneration. *J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol.* **2004**, *301*, 389–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Ly, C.; Ferrier, J.; Gaudet, J.; Yockell-Lelievre, J.; Arnason, J.T.; Gruslin, A.; Bainbridge, S. *Vaccinium angustifolium* (lowbush blueberry) leaf extract increases extravillous trophoblast cell migration and invasion in vitro. *Phytother. Res. PTR* **2018**, *32*, 705–714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Bueno, F.G.; Panizzon, G.P.; Mello, E.V.; Lechtenberg, M.; Petereit, F.; de Mello, J.C.; Hensel, A. Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Fitoterapia* **2014**, *99*, 252–260. [[CrossRef](#)]
78. Cornelli, U. Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin. Dermatol.* **2009**, *27*, 175–194. [[CrossRef](#)]
79. Han, J.H.; Lee, H.J.; Cho, M.R.; Chang, N.; Kim, Y.; Oh, S.Y.; Kang, M.H. Total antioxidant capacity of the Korean diet. *Nutr. Res. Pract.* **2014**, *8*, 183–191. [[CrossRef](#)]
80. Milicevic, A. The relationship between antioxidant activity, first electrochemical oxidation potential, and spin population of flavonoid radicals. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **2019**, *70*, 134–139. [[CrossRef](#)]
81. Apak, R.; Ozyurek, M.; Guclu, K.; Capanoglu, E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 997–1027. [[CrossRef](#)]
82. Wolfe, K.L.; Liu, R.H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8896–8907. [[CrossRef](#)]
83. Vang Mouritzen, M.; Jenssen, H. Optimized Scratch Assay for In Vitro Testing of Cell Migration with an Automated Optical Camera. *J. Vis. Exp. JoVE* **2018**. [[CrossRef](#)]

84. Scheitza, S.; Bonifas, J.; Blomeke, B. Variable NAT1 enzyme activity in long-term cultured human HaCaT keratinocytes. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **2012**, *75*, 471–477. [[CrossRef](#)]
85. Brooks, R.F.; Riddle, P.N. The 3T3 cell cycle at low proliferation rates. *J. Cell Sci.* **1988**, *90 Pt 4*, 601–612.
86. Werner, S.; Krieg, T.; Smola, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J. Investig. Dermatol.* **2007**, *127*, 998–1008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Patel, S.; Maheshwari, A.; Chandra, A. Biomarkers for wound healing and their evaluation. *J. Wound Care* **2016**, *25*, 46–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Lindley, L.E.; Stojadinovic, O.; Pastar, I.; Tomic-Canic, M. Biology and Biomarkers for Wound Healing. *Plast. Reconstr. Surg.* **2016**, *138*, 18S–28S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).