

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

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**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. Kószegi Tamás, egyetemi tanár



Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ

Laboratóriumi Medicina Intézet

Pécs, 2021

## I. BEVEZETÉS

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 kezelnek egyes betegségeket. Az életmódból fakadóan az elszigetelt közösségekben élők nagyon gyakran szembesülnek fizikai sérülésekkel, ezért a sebgyógyulást pozitívan befolyásoló gyógynövényeknek itt kiemelt szerepük van.

A gyógynövényekben előforduló speciális anyagcseretermékek, elsősorban a polifenolok többféle úton (antimikrobás, antioxidáns, gyulladáscsökkentő hatás, valamint proliferációs és migrációs aktivitásnövelés) is serkentetik a sebgyógyulás folyamatát. A polifenolok csoportjába tartozó flavonoidokat 6 alcsoportra oszthatjuk: flavonok, flavanonok, flavonolok, izoflavonok, flavan-3-olok (katechin monomerek és kondenzált tanninok - proantocianidinek) és antocianidinek. A fenolsavak is tovább oszthatók benzoészármazékokra, illetve fahéjsav-származékokra. 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 szintáz gátlása említendő, ezáltal csökkentve a gyulladásért felelős prosztaglandinok és leukotriének koncentrációját.

A sebgyógyulás folyamatának egy másik kulcsfontosságú lépése az epitél sejtek vándorlása a sérült területre, majd az azt követő sejtproliferáció. A bőrszövetben előforduló leggyakoribb sejtípusok közé tartoznak a fibroblasztok és a keratinociták, amelyek nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a sebgyógyulás folyamata során.

A polifenolok többféle antioxidáns mechanizmus révén képesek megelőzni a nem homeosztatis, emelkedett szintű szabad gyökök által okozott sérüléseket, amelyek közül a leggyakoribb a reaktív oxigén gyökök (ROS-ok) közvetlen semlegesítése 1 hidrogén atom átadásával. További védelmi mechanizmus az antioxidáns enzimek aktiválása, az oxidáz enzimek gátlása, a kelátképzés vagy a húgysavszint emelkedése.

A fenolos vegyületek antibakteriális aktivitásának mechanizmusai még nem teljesen feltártak, ugyanis többféle úton fejthetik ki hatásukat. Általános megfigyelés, hogy a Gram-pozitív baktériumok fogékonyabbak a polifenolok és egyéb antibakteriális anyagok gátló hatásaira, mint a Gram-negatívok, ami az eltérő sejtfal-szerkezettel magyarázható.

A dolgozatban vizsgált növényfajok között az *Anthyllis vulneraria* L. (réti nyúlzapuka, *A. vulneraria*, Leguminosae – pillangósvirágúak családja) szinte egész Európában előfordul, elsősorban meszes talajokon, száraz réteken és legelőkön él. A növény földfeletti virágos-leveles hajtásából főleg flavonoidokat, szaponinokat és tanninokat mutattak ki. Az erdélyi népgyógyászatban a földfeletti leveles-virágos hajtást főként gyulladáscsökkentő, sebek kezelésére használják borogatásként.

A *Fuchsia magellanica* Lam. (télálló fukszia, *F. magellanica*, Onagraceae – ligetszépefélék családja) és *Fuchsia triphylla* L. (korallfukszia, *F. triphylla*, Onagraceae – ligetszépefélék családja) főként az Egyenlítő mentén honosak, azonban Európában is előfordulnak. Nagy mennyiségű antocianinok jelenlétét mutatták ki fukszia fajok virágjában és bogyótermésében egyaránt, míg a lomblevelek jelentős mennyiségben tartalmazzak flavonoidokat, elsősorban flavonolokat és flavonokat. Az erdélyi népgyógyászatban egyes

fukszia fajok friss lombleveleit elsősorban sebekre használják, továbbá kelések, bőrgyulladások kezelésére is alkalmazzák nyersen, borogatásként.

A *Lysimachia nummularia* L. (pénzlevelű lizinka, *L. nummularia*, Myrsinaceae – gyantafafélék családja) egész Európában elterjedt, főként árokpartokon, vízpartokon, nedves talajú legelőkön és réteken fordul elő. Korábbi fitokémiai vizsgálatok alapján a növény elsősorban flavonoidokat, fenolsavakat, szaponinokat és tanninokat tartalmaz. Az erdélyi népi gyógyászatban a növény földfeletti hajtását külsőleg és belsőleg egyaránt használják, külsőleg főleg különféle bőrbetegségek, sebek és tályogok kezelésére alkalmazzák.

## II. CÉLKITŰZÉSEK

A gyógynövények összetevőiről és sejtes hatásairól sokszor kevés az irodalmi adat, ezért a dolgozatban az alábbi 2 fő célkitűzés alapján végeztük vizsgálatainkat.

### II.1. Citotoxicitást mérő új módszer kidolgozása, valamint az elérhető életképességi (viabilitás) módszerek megbízhatóságának tesztelése

Doktori kutatásaim kezdetén a következő központi kérdésekre kerestük a választ:

- Kidolgozható-e olyan többparaméteres citotoxicitás teszt, amely lehetővé teszi ugyanazon sejtes mintából egylépéses 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 életképességet, vagy citotoxicitást mérő módszerekbe?

### II.2. A sebgyógyulásban szerepet játszó gyógynövények kémiai és biológiai vizsgálata

A dolgozat további részében az alábbi célokra és kérdésekre megválaszolására összpontosítottunk:

- Célként tűztük ki népgyógyászati adatok gyűjtését Erdélyben a Homoródok völgyében élő lakosok tudásáról, különösen sebek, fekélyek és egyéb bőrbetegségek helyi gyógymódjairól, a korábbi feljegyzések kiegészítéseként.
- Célunk volt olyan növényfajok kijelölése, amelyek esetében bőrbetegségekre, sebekre történő népi alkalmazásuk ellenére is kevés irodalmi adat áll rendelkezésre fitokémiai tulajdonságaikról és biológiai hatásmechanizmusaikról.
- Kémiai vizsgálataink fő kérdése volt, hogy kvantitatív és kvalitatív adatokat nyerhetünk-e a tesztelt növényfajok 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?
  - Van-e és milyen mértékű a kivonatok antimikrobás és antioxidáns hatása?
  - Serkentik-e a kivonatok és milyen mértékben a sejtek migrációs képességét?
  - Megállapítható-e, hogy a növényi kivonatok mely jelátviteli utak fehérjéinek aktiválásán keresztül érik el hatásukat?

### III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### III.1. Sejtkultúrák

Vizsgálatainkat kitapadó **A549-GFP** tüdőkarcinóma sejtvonal, **HepG2** humán hepatoma sejtvonal, **HaCaT** normál humán keratinocita sejtvonal és **3T3** normál egér embrionális fibroblaszt sejtkultúrákon végeztük. A sejteket magas glükóz tartalmú (4500 mg/l) DMEM médiumban tenyésztettük (10% FBS-sel, penicillin-sztreptomycin antibiotikum keverékkel, 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó termosztátban).

#### III.2. Többparaméteres citotoxicitás teszt

Az új módszer beállításához a GFP-t expresszáló A549 sejteket anyagcsere inhibitorokkal kezeltük: nátrium-fluoriddal (NaF 2,5; 5; 10; 15 és 20 mM koncentrációkban), cikloheximiddel (CHX 0,02; 0,04; 0,08; 0,18 és 0,35 nM koncentrációkban), valamint ochratoxin A-val (OTA 5; 12,5 és 20 µM koncentrációkban). A kezelést követően ugyanazon sejtes mintákból ATP, összes nukleinsav (propidium-jodid festés) és intracelluláris összfehérje meghatározást végeztünk.

#### III.3. β-ciklodextrinek (CD) hatása a rezazurin fluoreszcenciás életképességi tesztre

Kísérleteink során háromféle béta-CD kölcsönhatását vizsgáltuk meg rezazurinnal (életképességi teszt molekula) és rezorufinnal, amelyek a következők: natív béta-ciklodextrin (BCD), hidroxipropil-béta-ciklodextrin (HPBCD), valamint heptakis-2,6-di-*O*-metil-béta-ciklodextrin (DIMEB) jelenlétében.

##### III.3.1. A ciklodextrinek molekuláris kölcsönhatásainak mérése fluoreszcencia spektroszkópiával

A rezorufin-CD kölcsönhatásokat fluoreszcencia spektroszkópiai módszerrel vizsgáltuk, amely során emissziós spektrumokat vettünk fel. A CD-eket (BCD, HPBCD, DIMEB) emelkedő koncentrációban (0-1200 µM) adtuk hozzá 0,4 µM rezorufinhoz.

##### III.3.2. A CD-ek hatása a sejtes citotoxicitás mérésekre

A CD-ek esetleges zavaró hatását HepG2 sejtvonalon vizsgáltuk rezazurin teszt, valamint ATP- és intracelluláris összfehérje tartalom meghatározással 96 lyukú sejtenyésző lemezekon. A sejteket 0; 0,25; 0,5 és 1 mM CD koncentrációkkal, továbbá 2 µM rezazurinnal együtt és külön is kezeltük 30 és 120 percig. A kezeléseket után lemezolvasón mértük a minták emissziós jelét.

#### III.4. Etnobotanikai kutatás Erdélyben

Az etnobotanikai felmérések Abásfalva, Bágy, Gyepes, Homoródkarácsonyfalva, Homoródkeményfalva, Homoródremete, Homoródszentmárton, Homoródszentpál, Homoródszentpéter, Kénos, Lókod, Lövete, Recsenyéd és Városfalva településeken történtek. Az adatközlőkkel félig strukturált interjúkat készítettünk, amelyek során betegségcsoportok szerint említettek gyógynövényfajokat, helyenként állati és egyéb anyagokat is.

#### III.5. A vizsgált növényfajok gyűjtése és kivonatok készítése

A gyűjtött népi növényismereti adatok közül olyan fajokat jelöltünk ki további vizsgálatainkhoz, amelyekről nem, vagy csak kevés fitokémiai és farmakológiai adat áll

jelenleg rendelkezésre. Ezek alapján jelöltük ki az *A. vulneraria*, *F. magellanica*, *F. triphylla* és *L. nummularia* taxonokat. A növényfajok azon drogrészeit gyűjtöttük, amelyek az adatközlők elmondása szerint a népi gyógyászatban alkalmazásra kerülnek. A szárított, majd aprított növényi mintákból a terepmunkánk során a népgyógyászatban említett felhasználásuk alapján 50%-os etanolos és vizes kivonatokat készítettünk.

### **III.6. Polifenol analízis nagynyomású folyadékkromatográf (HPLC) diódasoros detektorral és elektropray ionizációval kapcsolt MS készülékkel**

A mérések diódasoros detektorral (DAD) felszerelt Agilent 1100 HPLC rendszeren történtek. Mozgófázisként A: 0,3% ecetsav oldatot (v/v) és B: metanolt használtunk. Az optimalizált rendszer gradiens programja a következő volt: 0 és 30 perc között a B oldat 5%-ról 100%-ra emelkedése, majd 5 percig fenntartása 100%-on, ezután 1 perc alatt 100%-ról 5%-ra csökkenése. A detektálás hullámhosszát 280 nm-re állítottuk be. Az egyes frakciókat ESI-MS módszerrel azonosítottuk.

### **III.7. A növényi kivonatok citotoxicitásának tesztelése lemezolvasóval**

A kivonatok citotoxikus hatását 3T3 és HaCaT sejtvonalakon teszteltük a III.2. alfejezetben ismertetett többparaméteres módszerünk alapján, a GFP mérés kivételével. 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).

### **III.8. A növényi kivonatok citotoxicitásának mérése áramlási citométerrel**

A jelentősebb biológiai hatás miatt csak az etanolos kivonatokat teszteltük: *A. vulneraria* esetében 50; 100 és 200 µg/ml, *F. magellanica* és *F. triphylla*: 2,5; 5 és 10 µg/ml, míg *L. nummularia* kivonatánál 10; 25 és 50 µg/ml koncentrációban. A kísérleteket BD FACS Canto II áramlási citométeren végeztük el. A korai és a késői apoptotikus, illetve a nekrotikus sejtek elkülönítése Annexin V és 7AAD (7-aminoaktinomicin D) festékek segítségével történt.

### **III.9. A növényi kivonatok antimikrobás hatásának vizsgálata**

Az antimikrobás vizsgálatok során tesztelt baktériumtörzsek a következők voltak: *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) és *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Mikrodilúciós technikával állapítottuk meg a növények vizes és etanolos kivonatainak MIC<sub>80</sub> értékeit, vagyis azt a koncentrációt, amely 80%-ban gátolja az adott mikroorganizmus szaporodását. A MIC<sub>80</sub> számításánál a kezelt baktérium szuszpenziók 580 nm-en mért optikai denzitását használtuk fel.

### **III.10. Nem enzimátikus totál antioxidáns kapacitás (TAC) vizsgálatok lemezolvasón**

#### **III.10.1. Oxigéngyök Abszorpciós Kapacitás – ORAC**

A módszer 96 lyukú lemezben 400 nM fluoreszcein oldat fényemisszió csökkenésének kinetikus megfigyelésén alapul 400 mM AAPH (2,2'-azo-bis (2-amidinopropán) hatására. A mérés lemezolvasón történt 37°C-on, a számítást a görbe alatti terület (AUC) értékek alapján végeztük.

### **III.10.2. Erősített kemilumineszcencián alapuló módszer – ECL**

A vizsgálatot lemezolvasóra adaptálva, fehér 96 lyukú lemezen dolgoztuk ki. Mérés előtt detektáló reagenst (0,15 M borát puffer, kiegészítve 0,45 mM luminollal és 1,8 mM para-jodofenollal) 15 µU/ml peroxidáz enzimmal kevertünk össze. A kinetikus mérést H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrogén-peroxid) automatikus injektálásával indítottuk, itt is a lumineszcencia AUC értékeivel számoltunk.

### **III.10.3. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás mérése**

A mérés menete 96 lyukú lemez használata esetén a következő volt: 50 µl mintához/standardhoz 200 µM DPPH oldatot és 100 mM acetát puffert adtunk. Az abszorbancia változást 60 perc múlva, 517 nm-en lemezolvasón mértük.

### **III.10.4. Troloxra vonatkoztatott Antioxidáns Kapacitás – TEAC**

Az ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azino-bisz (3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav)) gyök képzése a következők szerint történt: K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> – kálium-perszulfát (125 mM) és ABTS (7 mM) 49:1 arányú oldatát 12 órára sötétben, szobahőmérsékleten állni hagytuk. Egy 96 lyukú lemezbe 20 µl hígított növényi mintát és 80 µl ABTS<sup>•+</sup> oldatot adtunk. Az abszorbancia változást 734 nm-en, 20 perces inkubálás után lemezolvasón mértük.

### **III.10.5. TAC értékek elemzése**

Mind a 4 teljes antioxidáns kapacitást mérő módszer esetében standardként Troloxból (vízoldékony E vitamin származék) készített hígítási sor kalibrációs egyenesét használtuk. Az ORAC és ECL vizsgálatok során az eredményeket Trolox ekvivalensben (TE) adtuk meg 1 g szárazanyagra vonatkoztatva. A DPPH és TEAC esetében a növényi kivonatok 50%-os gyöksemlegesítő hatását fejeztük ki (IC<sub>50</sub>), vagyis azt a koncentrációt adtuk meg µg/ml-ben, amely a DPPH vagy ABTS gyök abszorbanciáját 50%-kal csökkenti. A TAC módszerekre kapott számértékek így egymással közvetlenül nem voltak összehasonlíthatók.

### **III.11. Az intracelluláris antioxidáns kapacitás mérése**

Az alkalmazott diklorofluorescein-diacetát (DCFH-DA) és dihidrorodamin123 (DHR123) tesztek 96 lyukú lemezekon történtek. A HaCaT és 3T3 sejteket 50 µM DCFH-DA vagy 10 µM DHR123 és növényi kivonatokkal együtt inkubáltuk. A kinetikai mérés 1 mM AAPH hozzáadása után kezdődött. A fluoreszcencia intenzitásokat lemezolvasó készüléken monitoroztuk. A kivonatok gyöksemlegesítő hatását a gátlás százalékában adtuk meg (IC<sub>50</sub>).

### **III.12. A sejtmigráció („sebgyógyulás teszt”) in vitro vizsgálata**

A növényi kivonatokkal kezelt HaCaT és 3T3 sejtek migrációs képességének követéséhez 24 lyukú lemezen 500 µm szélességű sejtmentes területeket hoztunk létre és ezen területek benövési sebességét mértük. A sejteket a növényi kivonatok szubtoxikus koncentrációival kezeltük: az *A. vulneraria* esetén 50; 100 és 200 µg/ml, a *F. magellanica* és *F. triphylla* esetén 2,5; 5 és 10 µg/ml, míg az *L. nummularia* esetén 10; 25 és 50 µg/ml (pozitív kontroll PDGF-BB növekedési faktor 15 ng/ml koncentrációban). A sejtek migrációját 4 óránkénti fotó készítésével 24 órán keresztül vizsgáltuk egy termosztátba helyezhető valós idejű képalkotó technikával rendelkező fáziskontraszt mikroszkóp (JuLi Stage, NanoEnTek) segítségével. Az eredmények értékelésénél a sejtmentes terület záródási

arányát határoztuk meg a kezeletlen kontrollhoz képest (%). Minden kivonat esetén összesített záródási görbéket képeztünk és kiszámoltuk a görbe alatti területeket (AUC).

### **III.13. Fehérje expressziós vizsgálatok**

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 µg/ml koncentrációkban. A kezelt sejteket proteáz- és foszfatáz gátlókat tartalmazó oldattal lizáltuk, összfehérje meghatározást végeztünk, majd a lizátumokból SDS-sel és béta-merkaptó-etanollal denaturált 15 µg összfehérjét vizsgáltunk western blot módszerrel. Az antioxidáns hatás jelátviteli vizsgálatához szuperoxid-dizmutáz-2 (SOD2) és kataláz (CAT) elleni antitesteket, a gyulladáscsökkentő hatáshoz COX2 antitestet, míg a migráció, a proliferációs és sejttúlélésben szerepet játszó jelátviteli folyamatok tisztázásához protein kináz B (Akt1), p38, extracelluláris szignál által szabályozott kináz 1, 2 (Erk1/2) és ezek foszforilált formái elleni antitesteket használtunk. A minták előhívása során kapott erősített kemilumineszcenciás (ECL) jelet a β-aktin vagy gliceraldehid-3-foszfat-dehidrogenáz (GAPDH) töltési kontrollhoz viszonyítottuk. Az ECL-t egy G:Box Chemi XX6 System készülékkel detektáltuk és a jeleket annak denzitometriás programjával értékeltük.

### **III.14. Statisztikai analízis**

Adatainkat az SPSS statisztikai elemző szoftver 22-es verziójával értékeltük (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 egy-utas ANOVA tesztet használtuk. A TAC módszerek közötti különbségek vizsgálatához főkomponens analízist (Principal Component Analysis - PCA) végeztünk el. Statisztikai szempontból szignifikánsnak a  $p < 0,05$  értékeket tekintettük.

## **IV. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK**

### **IV.1. Új, többparaméteres citotoxicitás módszer kidolgozása lemezolvasóra**

Az új módszer alapja a feltáró oldat, amely egy lúgos pH-val rendelkező bórsav/NaOH puffer (pH 9,2), kiegészítve Triton-X-100-zal és EDTA-val. A puffer segítségével egyszerre lizáljuk a kitapadt sejteket és stabilizáljuk a sejten belüli fehérje- és ATP-tartalmat legalább 30 percen keresztül.

NaF-dal történő 4 órás inkubálást követően dózis függően jelentősen csökkentek a mért intracelluláris paraméterek. A legnagyobb eltérés az ATP szintekben volt megfigyelhető, ugyanis a legmagasabb NaF koncentráció (20 mM) szinte teljesen depletálta az ATP-tartalmat (2% a kezeletlen kontroll sejtekhez képest). Ennek oka, hogy a NaF egy általános, az enzimatis rendszert gátló vegyület. Ez magába foglalja a glikolitikus enzimek gátlását, amelyek nagyrészt hozzájárulnak az ATP termeléséhez, különösen tumoros sejtekben, ahol az energia nagyrészt a glikolízistól függ.

A 24 órás OTA kezelést követően a vizsgált sejten belüli faktorok közül mindegyiknél dóziszfüggő csökkenés figyelhető meg. A legmagasabb OTA koncentráció (20 µM) 82%-ra csökkentette a GFP szintjét, míg a sejten belüli összes fehérje 75%-ra csökkent a kontrollhoz

képest. Az OTA a komplex hatását részben az oxidatív stressz indukálásán és az energia depláción keresztül közvetíti.

A CHX hatását kétféle inkubálási időtartam (4 óra, illetve 24 óra) után vizsgáltuk. A 24 órás kezelés a GFP szinteket 40%-ra, az összes fehérjetartalmat 50%-ra, a PI jelét pedig 60%-ra csökkentette. A CHX széles körben alkalmazott vegyület az eukarióták fehérjeszintézisének gátlásához. A 4 órás kezelés megemelte az ATP szintet, míg a 24 órás inkubáció annak jelentős csökkenését okozta. Ennek oka feltehetően a fehérjeszintézis gátlásán keresztüli apoptózis-indukáló hatásának tulajdonítható, ugyanis az apoptotikus lépések energiát igényelnek a downstream folyamatok zökkenőmentes végig vezetéséhez. Továbbá a fehérjeszintézis erősen energiafüggő folyamat, ezáltal ha a CHX gátolja a fehérjeszintézis útjait, akkor az eredményezheti a fel nem használt ATP felhalmozódását a sejtekben.

Vizsgálatainknál általános megfigyelésként azt tapasztaltuk, hogy kezeléstől függetlenül a GFP jel intenzitása együtt mozog a sejt számmal és a fehérjetartalommal.

## **IV.2. Rezorufin-CD kölcsönhatások vizsgálata**

### **IV.2.1. Fluoreszcencia spektroszkópia**

A CD-ek koncentrációfüggő módon növelték a rezorufin fluoreszcencia intenzitását, valamint az emissziós hullámhossz maximumának eltolódását figyeltük meg. 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. Figyelembe véve a rezorufin fluoreszcenciájának erős fokozódását CD-ek jelenlétében, a rezorufin-CD kölcsönhatás megzavarhatja a reszazurin 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 a HPBCD erre nem képes).

### **IV.2.2. Reszazurin alapú sejtes viabilitás mérések lemezolvasón**

A CD-ek sejten belüli hatását kétféle inkubálási időtartamot (30 perc és 120 perc) követően vizsgáltuk. A HepG2 sejteket egy időben kezeltük CD-nel és reszazurinnal (együttes kezelés). Továbbá, mivel a CD-ek képesek befolyásolni a HepG2 sejtek életképességét, azt is megvizsgáltuk, hogy a sejtek külön kezelése (először CD-nel, majd az oldat eltávolítása után reszazurinnal) hogyan befolyásolja a sejtek életképességét.

A külön CD majd reszazurin kezelésből kapott sejtes eredményeket összehasonlítottuk az ATP- és a teljes sejten belüli fehérjetartalmakkal. Mind az ATP, mind a fehérje eredmények alapján a CD-ek által indukált viabilitás csökkentést tapasztaltunk. A magasabb DIMEB koncentrációk jelenlétében erőteljesebb viabilitás csökkenés figyelhető meg. Ez megmagyarázhatja, hogy 120 perces inkubációt követően a 0,25 mM DIMEB esetében megfigyelt jel emelkedés mértéke miért csökken 0,5 és 1 mM-os DIMEB koncentrációknál.

Eredményeink alapján a különböző CD-ek komplex módon képesek befolyásolni a reszazurin viabilitás teszt eredményeit. Így olyan kísérletekben, amelyek során CD-eket is alkalmaznak, a reszazurin-alapú sejtes életképesség vizsgálat eredményei nem tűnnek megbízhatónak.



### IV.3. Etnobotanikai gyűjtések eredményei

Az erdélyi terepi gyűjtések során kijelölt fajok között a legtöbb népi elnevezést a *L. nummularia* esetében írtuk le (*fillérfű, piculavirág, ineresztőfű, pillérfű, fillérlapi, folyóka*). Az *A. vulneraria* a helyiek körében *medvetalpa* vagy *szipókavirág* néven volt ismert. Mivel a *F. magellanica* és *F. triphylla* növényt a helyiek nem különítik el, így általánosan a fukszia elnevezést használták a nemzetségben. Az említett növényi részek elsősorban a földfeletti hajtás és a lomblevél volt, amelyeket külsőleg alkalmaztak bőrbetegségek kezelésére, főleg borogatásként. A fukszia fajok esetében a leveleket a helyiek gyűjtéseink alapján „szökésre” használják, amely kék-fekete vérző kelést, mély tályogot vagy virulens pattanást jelent.

### IV.4. Növényi kivonatok fenolos vegyületeinek szemi-kvantitatív elemzése LC-DAD-ESI-MS/MS készülékkel

Összesen 82 komponens tudunk elválasztani a kijelölt növényfajok mintáiban, közöttük galluszsav-származékokat, hidroxifahéjsav-származékokat és flavonoid-glikozidokat, továbbá a *F. magellanica* és *F. triphylla* kivonataiban 8 antocianin vegyületet is kimutattunk.

Az *A. vulneraria* mintájában többségében flavonol-glikozidok fordulnak elő. Nagy mennyiségben jellemzően előforduló aglikon a kempferol és a kvercetin voltak, valamint metilezett formái is előfordultak az izoramnetin és ramnocitrin aglikonoknak. Ezen kívül a vizes kivonat sokféle kávé-, kumarin- valamint ferulasav-származékot tartalmazott.

A fukszia mintákból az általános flavonol-származékok mellett szokatlan kvercetin-galloil-hexozidokat és kempferol-galloil-hexozidot mutattunk ki, nagyobb mennyiségben a *F. magellanica* mintájában. A levélkivonatokban antocianin származékok is dominánsak voltak: mindkét fukszia mintában peonidin-dihexozid-izomer volt jelen, míg a cianidin-dihexozid csak a *F. magellanica* kivonatokban fordult elő.

A *L. nummularia* is nagy mennyiségben tartalmazott flavonol-glikozidokat, azonban a mintában főleg miricetin-glikozidok voltak uralkodóak. Mind a vizes, mind az etanolos kivonatokban a miricetin 3-O-dezoxi-hexozid volt a fő komponens. A vizes minta esetében a kumarin- és a ferula-glükarát izomerek voltak jellemzőek.

### IV.5. A lemezolvasón mért citotoxicitás vizsgálatok eredményei

Általános megfigyelés volt a vizsgált növényi minták esetében, hogy az etanolos kivonatok hatékonyabban csökkentették mindkét sejtvonal ATP szintjét, sejtszámát és fehérjetartalmát dózisfüggő módon, mint ugyanazon növény vizes kivonata. Azonban oldószertípustól 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 sejtvonalakban. Az oldószerek közötti eltérések oka nem a minták etanoltartalma volt, hiszen azt 1,5 %-ban maximalizáltuk, amely nem befolyásolja jelentősen a sejtek életképességét, hanem a kivonatokban nagyobb mennyiségben előforduló hatóanyagok okozták a toxikus hatást. A 3T3 fibroblaszt sejtenyészet érzékenyebb volt a levélkivonatok expozíciójára, mint a HaCaT keratinociták. Ennek lehetséges magyarázata, hogy a fibroblasztok a dermiszben helyezkednek el, míg a keratinociták feljebb, az epidermiszben találhatóak, ezért ellenállóbbaknak kell lenniük a külső, esetleges károsító tényezőkkel szemben.

#### IV.6. Áramlási citométeren mért citotoxicitás vizsgálatok eredményei

A lemezolvasóra kapott adatok alapján a növények etanolos kivonatainak feltételezett szubtoxikus koncentrációit apoptózis-nekrózis vizsgálatoknak vetettük alá Annexin V-7AAD áramlási citometriás módszerrel 3T3 valamint HaCaT sejt vonalon. A két különböző sejt vonalnál hasonló eredményeket kaptunk, miszerint az *A. vulneraria* 200 µg/ml koncentráció, a *F. magellanica* és a *F. triphylla* kivonata 10 µg/ml koncentráció, míg a *L. nummularia* 50 µg/ml koncentráció alatt bizonyítottan nem váltott ki citotoxikus hatást (a nekrotikusan elhalt sejtek aránya 4% alatt volt mindkét sejt vonalban).

#### IV.7. MIC értékek meghatározása antimikrobás vizsgálatokhoz

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 MIC<sub>80</sub> értékük 5-60 µg/ml között változott, összehasonlítva az eritromicin pozitív kontrollal, amelynek MIC<sub>80</sub> értékei 0,1-42 µg/ml koncentrációk között változtak. Az *A. vulneraria* és *L. nummularia* etanolos kivonatai „mérsékelt” antimikrobiális hatást mutattak *B. subtilis* és *S. pyogenes* ellen, továbbá az *A. vulneraria* „gyenge” aktivitású volt *S. aureus* ellen. Érdekes megfigyelés, hogy a vizsgált növényi kivonatok közül csak a fukszia fajok vizes kivonatai voltak hatékonyak a tesztelt baktériumtörzsek ellen, azon belül is a *S. aureus*, *B. subtilis* és *S. pyogenes* esetében (MIC<sub>80</sub> értékek: 17-65 µg/ml koncentrációk között). A vizsgált növényi kivonatok közül egyik sem mutatott antimikrobás hatást az *E. coli* ellen.

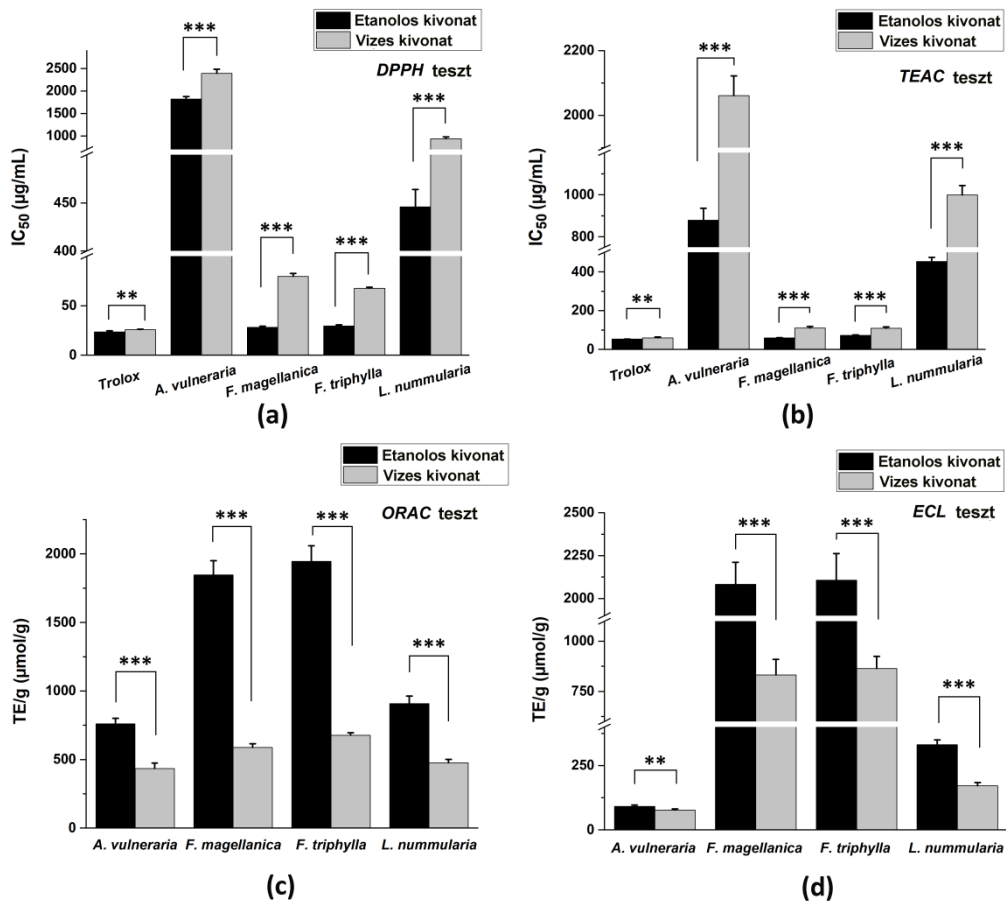
A vizsgált növényfajokra vonatkozóan nem találtunk korábbi adatokat azok antimikrobás hatásairól, ezért hatóanyagtartalmuk alapján hasonlítottuk össze eredményeinket irodalmi forrásokkal. A fukszia fajok kiemelkedő antimikrobás hatásáért antocianintartalmuk lehet felelős. Továbbá a fukszia fajok hidroxibenzoésavakat is tartalmaztak, amelyek antimikrobás hatású vegyületekként ismertek. A *L. nummularia* levélkivonataiban a fő flavonoidok a miricetin-származékok voltak, amelyek erős antibakteriális hatással rendelkeznek, ennek ellenére mi gyengébb aktivitást tapasztaltunk.

#### IV.8. Teljes antioxidáns kapacitás vizsgálatok eredményei

Általánosan elmondható, hogy az egyes növényfajok etanolos kivonata magasabb antioxidáns kapacitást mutatott, mint ugyanazon növény 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*) (1. ábra).

Elsősorban a fukszia fajokban mért jelentős antocianin tartalom magyarázhatja a magas TAC értékeket, mivel ezek erős antioxidáns vegyületekként ismertek. Az irodalom alapján a TAC mérő módszereket (TEAC, ORAC) felhasználva, az antocianinok antioxidáns kapacitása 3–6-szorosa az azonos koncentrációjú Trolox standardénak. Ezen adatok alapján úgy tűnik, hogy az antocianinok hatékonyabbak, mint a klasszikus antioxidánsok.

Más kutatók beszámolóival mellett mi is összefüggéseket találtunk a TEAC és a DPPH, valamint az ORAC és ECL módszerek között. 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 hidrogén atom transzfer (HAT) mechanizmuson alapulnak, míg a TEAC és DPPH módszerek egy-elektron transzfer (SET) jellegű reakciók.

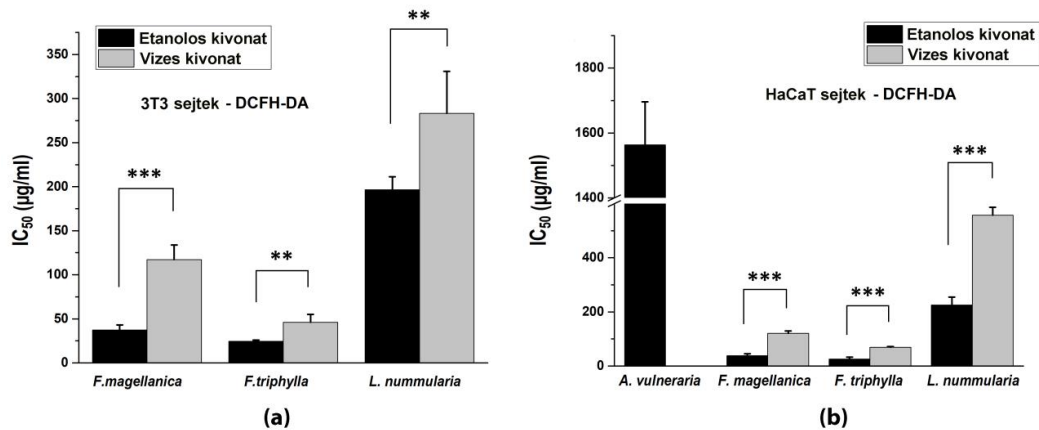


1. **ábra.** *A. vulneraria*, *F. magellanica*, *F. triphylla* és *L. nummularia* 50% (v/v) etanolos és vizes kivonatainak teljes antioxidáns kapacitása (TAC) különböző spektroszkópiai módszerekkel mérve: DPPH-módszer (a); TEAC-vizsgálat (b); ORAC-teszt (c) és ECL metodika (d). (Átlag ± szórás, 5 független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

#### IV.9. Az intracelluláris ROS mérések eredményei

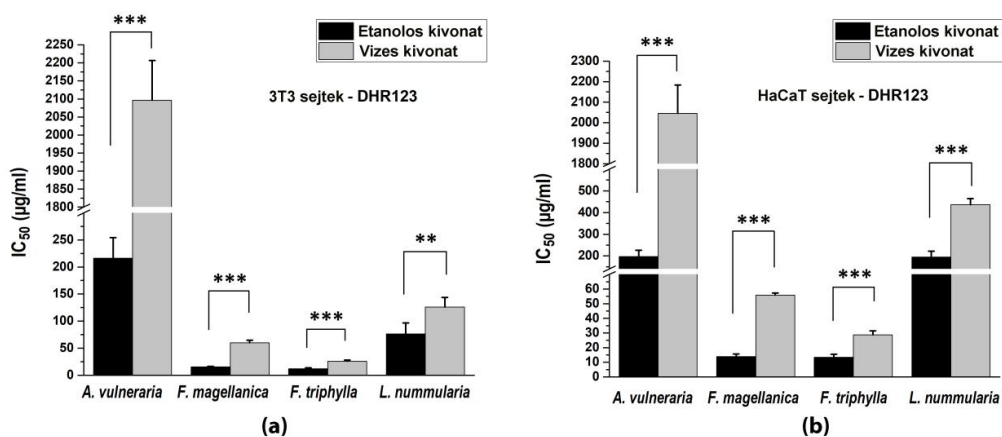
A sejt alapú antioxidáns aktivitás mérésénél is a TAC tesztekhez hasonló eredményeket kaptunk.

A növényi kivonatok nagy része csökkentette a DCF és a rodamin származék fluoreszcenciáját, a számított 50%-os gátló koncentráció értékeket a 2. és 3. ábra mutatja. A fukszia fajok etanolos és vizes kivonatai gátolták a legerősebben az oxidált DCF és a rodamin származék fluoreszcens jelét mindkét sejtvonalon, összehasonlítva a többi növényi kivonattal (2. és 3. ábra). A DCF esetében 3T3 sejtvonalon az *A. vulneraria*-nak sem a vizes, sem az etanolos kivonata nem mutatott antioxidáns hatást, továbbá csak az etanolos kivonatnak volt mérhető antioxidáns kapacitása HaCaT sejtenyészetben (2. ábra).



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

A DCF jeléhez hasonlóan a legnagyobb mértékben a fukszia fajok kivonatai (etanolos és vizes egyaránt) gátolták a rodamin fluoreszcencia intenzitását. A DHR123 kezelésnél az *A. vulneraria* etanolos és vizes kivonatai is számszerűsíthető eredményt adtak mindkét sejtvonalnál, azonban a vizes frakció csak gyengén hatott (3. ábra).



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

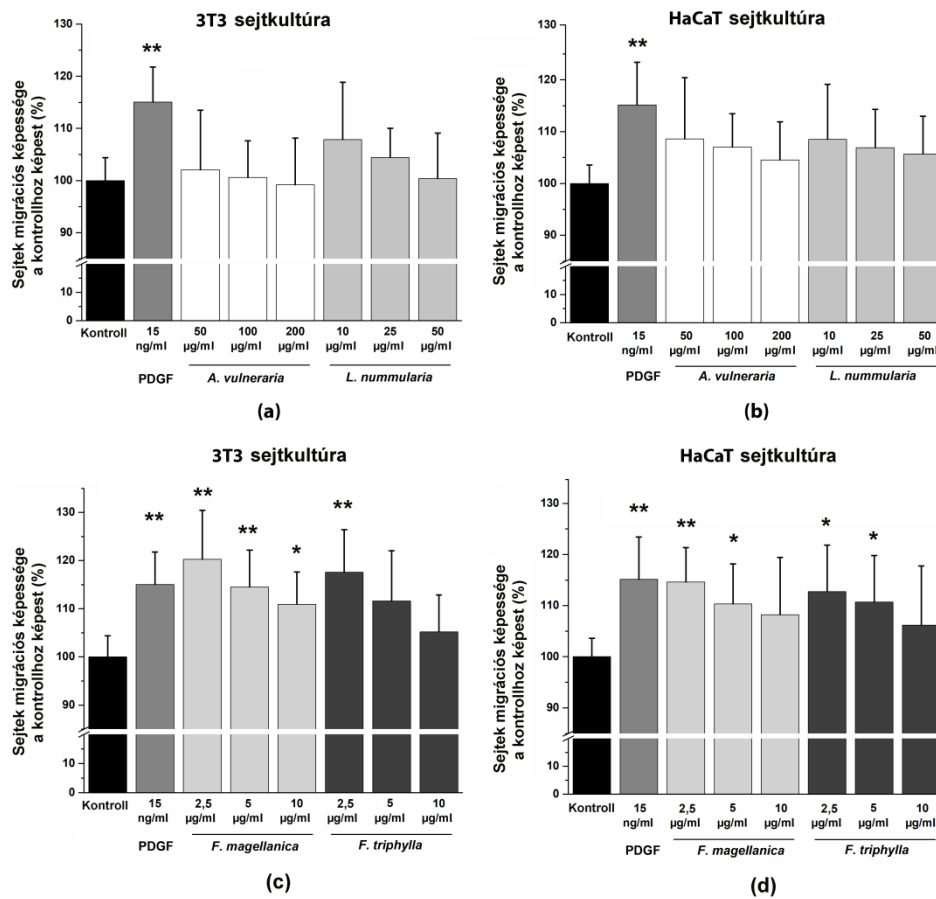
#### IV.10. Az *in vitro* migrációs teszt eredményei

A pozitív kontrollként alkalmazott PDGF-BB 15 ng/ml koncentrációban stimuláló hatással volt mindkét sejtvonal migrációjára (3T3 sejteknél  $117,05 \pm 6,72\%$  ( $p < 0,01$ )), míg HaCaT sejteken  $115,16 \pm 8,26\%$  ( $p < 0,01$ )), összehasonlítva a kezeletlen sejtekkel (4. 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  $102,08 \pm 11,18\%$ ,

míg HaCaT sejteken  $108,57 \pm 10,92\%$  emelkedést okozott. A *L. nummularia* nem mutatott szignifikáns migrációs hatást egyik sejtvonal esetében sem. Fokozott migrációs és záródási sebesség volt megfigyelhető a *F. magellanica* és *F. triphylla* kezelt sejtekben, összehasonlítva a kezeletlen sejtekkel. A 2 fukszia faj közül a *F. magellanica* volt a legerősebb migrációt serkentő hatású mindkét sejtvonalon, ugyanis  $2,5 \mu\text{g/ml}$  koncentrációban a záródási arány  $120,25 \pm 10,17\%$  ( $p < 0,01$ ) volt a 3T3 sejteken és  $114,61 \pm 6,72$  ( $p < 0,01$ ) a HaCaT sejteken.

A vizsgált növényekre vonatkozóan nem találtunk korábban elvégzett tudományos munkákat biológiai hatásuk szempontjából, különös tekintettel a sejt migrációra. Ugyanakkor ismert, hogy az antocianinok a fibroblasztok és keratinociták migrációjának fokozásával serkentik a sebgyógyulást, ezen vegyületeket a fukszia fajokban nagy mennyiségben tudtuk kimutatni. 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.



**4. 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 „sz záródási” képességére. (Átlag  $\pm$  szórás, 3 független kísérlet,  $n=3 \times 3$  párhuzamos mérés minden koncentráció esetén). Szignifikáns változás a kezeletlen kontrollhoz képest, egyutas Anova-teszt \*  $p < 0,05$ ;

\*\* $p < 0,01$

## **IV.11. Jelátviteli folyamatok eredményei western blot technikával**

### **IV.11.1. A gyulladáscsökkentő hatás jelátviteli vizsgálata fehérjeszinten**

A COX2 gátlása kulcsfontosságú a gyulladáscsökkentő hatás vizsgálatához. Az LPS pozitív kontroll önmagában  $173,26 \pm 9,92\%$  ( $p < 0,05$ ) expresszió növekedést okozott, míg az LPS és *F. triphylla* együttes kezelés dózis függően gátolta a COX2 kifejeződését (2,5  $\mu\text{g/ml}$ :  $162,28 \pm 11,11\%$  ( $p < 0,05$ ); 5  $\mu\text{g/ml}$ :  $100,80 \pm 9,61\%$ ; 10  $\mu\text{g/ml}$ :  $94,40 \pm 12,32\%$ ). Azonban a *F. magellanica* az LPS kezeléshez képest nem hogy csökkentette, hanem koncentráció függően fokozta a gyulladással COX2 fehérjeszintet. A legtöményebb, 10  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációnál  $205,95 \pm 23,79\%$  ( $p < 0,05$ ) 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 irodalmi adatokkal. Kimutatták, hogy a cianidin mellett a delfinidin és petunidin is gátolhatja a COX2 expressziót, míg a pelargonidin, peonidin és malvidin nem. Az eredményeink ellentétesek az irodalmi adatokkal, ugyanis a *F. magellanica* kivonata fokozta a COX2 fehérje szintet annak ellenére, hogy cianidin-származékot tudunk belőle kimutatni. Mindkét fukszia fajból peonidin-származékot izoláltunk, amely nem gátolja a COX2-t és nem is lehet felelős a fuksziákra kapott eltérő COX2 expressziós tendenciáért. Néhány antocianint megfelelő irodalmi források hiányában nem tudunk pontosan azonosítani a *F. triphylla* etanolos kivonatában, amelyek esetleg csökkentették a COX2 expressziót.

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* ugyanazon kivonatában. Az ellágsav bizonyítottan gátolja az LPS indukálta COX2 fehérje expresszióját monocitákban, miközben nincs hatással a COX1 fehérjére. Továbbá a kvercetin-galloil-hexozidhoz hasonló glikozidos komponens, a kvercetin-galloil-glükopiranozid is gátolja makrofágokban a COX2 fehérjeszintet.

### **IV.11.2. Az antioxidáns hatás jelátviteli vizsgálata fehérjeszinten**

Mind a *F. magellanica*, mind a *F. triphylla* fokozta az antioxidáns CAT és SOD2 fehérjék szintjét a kontroll sejtekhez képest. A CAT esetén a növényi kivonatok legtöményebb, 10  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációja fokozta a legnagyobb mértékben a fehérjeexpressziót, ugyanis a  $\text{H}_2\text{O}_2$  hatáshoz képest is magasabb jelet detektáltunk. Míg a  $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelés  $143,03 \pm 20,80\%$ -ban fokozta a fehérjeszintet, addig a *F. magellanica*  $165,44 \pm 13,10\%$ , a *F. triphylla*  $194,24 \pm 25,13\%$  ( $p < 0,05$ ) intenzitásnövekedést okozott a sejtekben 10  $\mu\text{g/ml}$  alkalmazott koncentrációban. A SOD2 szintjében is erőteljesebb hatást váltottak ki a fukszia kivonatok, mint önmagában a  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $146,28 \pm 15,60\%$ ) kezelés. A *F. magellanica* esetén a leghígabb, 2,5  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációjú kivonat  $165,29 \pm 21,02\%$ , a *F. triphylla* 5  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációjú extraktuma  $189,08 \pm 13,19\%$  ( $p < 0,05$ ) expressziós szintemelkedést váltott ki a HaCaT sejtekben a kezeletlen kontroll sejtekhez képest.

Az antioxidáns hatású fehérjék szintjében történő változást a növények kivonataiban előforduló antocianinek okozhatták, amelyek bizonyítottan képesek fokozni az antioxidáns enzimek (CAT, SOD2, SOD1) expresszióját fehérjeszinten.

### **IV.11.3. A migrációt, proliferációt és sejttúlélést serkentő hatások jelátviteli vizsgálata fehérjeszinten**

Mind a *F. magellanica*, mind a *F. triphylla* etanolos kivonata dózis függően megnövelte a foszforilált p38 fehérje mennyiségét, összehasonlítva a kezeletlen sejtekkel. A legnagyobb emelkedést a legtöményebb koncentrációk (10 µg/ml) okozták mindkét növényi minta esetén (a *F. magellanica*  $134,39 \pm 22,68\%$ , a *F. triphylla*  $146,61 \pm 25,86\%$  emelkedést okozott a kontrollhoz képest). Bár a p38/MAPK jelátviteli út a sebgyógyulásban még nem teljesen tisztázott, a közelmúltban megjelent tanulmányok azt sugallják, hogy részt vesz a keratinociták sebzési területre történő migrációjának irányításában. 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.

Az Erk/MAPK útvonal vizsgálata során a *F. magellanica* koncentráció függően csökkentette az Erk1/2 foszforilációját ( $56,75 \pm 2,84\%$  a legtöményebb 10 µg/ml koncentrációban), addig a *F. triphylla* – bár nem dózis függően – de fokozta a foszforilált fehérjeexpressziót:  $174,80 \pm 8,34\%$  ( $p < 0,05$ ) emelkedést mértünk a leghígabb, 2,5 µg/ml koncentrációval kezelt sejtekben. 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, azonban mi csökkenést figyeltünk meg.

A foszfatidilinozitol 3 kináz (PI3K/Akt) jelátviteli út fokozásában nem vesznek részt a fuksziák kivonatai, ugyanis nem emelték meg a foszforilált Akt szintjét, azonban a *F. magellanica* leghígabb kivonata (2,5 µg/ml,  $76,66 \pm 3,54\%$  ( $p < 0,05$ )), valamint a *F. triphylla* legtöményebb kivonata (10 µg/ml,  $81,93 \pm 6,37\%$ ) inkább csökkentette azt. Az antocianinok képesek gátolni a PI3K/Akt útvonalat szintén a bőrben tipikusan előforduló sejt típusban (HUVEC endotél sejtekben). Továbbá bizonyítottan az ellágsav is gátolja a humán endotél sejtek migrációját.

## **V. ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK**

### **V.1. Citotoxicitást mérő új módszer kidolgozása, valamint már meglévő tesztek megbízhatóságának vizsgálata**

1. Annak érdekében, hogy ugyanazon kitapadó sejt mintából egyszerre több paramétert tudjunk meghatározni, kidolgoztunk egy borát pufferes, detergenst tartalmazó feltárást lemezolvasó készülék alkalmazásával, amelynek során egy mintából egy lépéses feltárással 4 paramétert tudunk egymást követően megvizsgálni (sejten belüli ATP-, GFP-, nukleinsav- és összfehérje tartalom). A lizáló puffert kiegészítve 20 mM Na<sub>2</sub>EDTA-val, stabilizálódik az ATP-szint a feltárást követően legalább 30 percig.
2. Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy az expresszált GFP fluoreszcencia intenzitást a lemezolvasón történő, gyors sejt feltárási új módszerünkkel mennyiségi szempontból képesek vagyunk meghatározni és összevetni más viabilitás jelzőkkel. Ugyanis többféle anyagcsere inhibitorral történő kezelés után a GFP jele korrelál a sejtek nukleinsavtartalmával (propidium-jodid jelével), illetve a teljes fehérjetartalommal.
3. Kísérleteink során igazoltuk, hogy a sejtek életképességének becslése egyetlen viabilitás faktor meghatározásával (pl. enzimaktivitás mérése rezazurin módszerrel)

félrevezető lehet. Ugyanis egyes  $\beta$ -ciklodextrinek (BCD, HPBCD, DIMEB) stabil komplexeket képeznek rezazurinnal és rezorufinnal, befolyásolva a rezorufin fluoreszcens jelét és feltehetően a rezazurin celluláris felvételének ütemét. Eredményeink rámutatnak, hogy a különböző CD-ek komplex módon képesek befolyásolni a rezazurin viabilitás teszt eredményeit. Így azokban a kísérletekben, amelyek során CD-eket is alkalmaznak, a rezazurin-alapú vizsgálatok megbízhatósága erősen kétségesnek tűnik.

## V.2. Etnobotanikai gyűjtések alapján kijelölt növényfajok vizsgálata

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 idősek körében maradtak fenn. A kiválasztott 4 növényfajról (*Anthyllis vulneraria*, *Fuchsia magellanica*, *Fuchsia triphylla*, *Lysimachia nummularia*) nem találtunk korábbi vizsgálatokat biológiai hatásukkal kapcsolatban, különös tekintettel a sebgyógyulásra.
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 extraktumában. A *F. magellanica* és *F. triphylla* leveleiben számos antocianin komponens is található, például cianidin és peonidin származékok. A *L. nummularia* levélkivonataiban a fő flavonoidok miricetin-származékok voltak.
6. A *F. magellanica* és a *F. triphylla* etanolos kivonata 50  $\mu\text{g/ml}$  koncentráció alatt nem okozott életképesség csökkenést, míg a vizes kivonataik esetében ez 120  $\mu\text{g/ml}$  volt. A *L. nummularia* etanolos kivonata maximum 250  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban volt alkalmazható, míg a vizes kivonat 3000  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban sem okozott jelentős sejtkárosító hatást. A legkevésbé citotoxikus növény az *A. vulneraria* volt, ugyanis etanolos kivonata 500  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban, vizes kivonata pedig 4000  $\mu\text{g/ml}$  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  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban, a *L. nummularia* 50  $\mu\text{g/ml}$ , az *A. vulneraria* 200  $\mu\text{g/ml}$  koncentráció alatt biztosan nem váltott ki citotoxikus hatást.
7. A 4 növényfaj közül a fukszia fajok kivonatai jelentős antimikrobás hatást mutattak a *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* és *S. pyogenes* baktériumtörzsek esetében. A leggyengébb antimikrobás hatást az *A. vulneraria* kivonatai esetében mértük. A vizsgált növényi kivonatok közül egyik sem mutatott gátló hatást *E. coli* törzs ellen.
8. Egységesen a fukszia fajok szembetűnően magasabb TAC értékeket, valamint sejten belüli ROS semlegesítő hatást mutattak a vizsgált fajok között (*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, vagy azt meghaladó 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 útját 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 antocianin- valamint fenolsavtartalmuk révén, amelyek felelősek lehetnek a sebgyógyulásban betöltött hatékony szerepükért.

## VI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni az iránymutatást témavezetőmnek, **Prof. Dr. Kőszegi Tamásnak**, aki kezdetektől fogva támogatta 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 javaslatát 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 javaslatát és a közös munkákat, amelyekkel a dolgozatom szakmai szempontból értékesebb lett, valamint tudományos publikációk megjelenését is lehetővé tette.

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 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 segítségét.

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 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. Kőszegi Tamás)

EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009

## VII. 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, posztterek*

**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, Cserháti 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  $\beta$ -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.

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**