

***Cyclopia genistoides* és *Hoodia gordonii*,  
két perspektívikus dél-afrikai gyógynövény**

Doktori értekezés tézisei

**Roza Orsolya**

Szegedi Tudományegyetem  
Farmakognóziai Intézet

Szeged  
2016.

Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola  
Farmakognózia PhD program  
Programvezető: Prof. Dr. Hohmann Judit DSc.

Farmakognóziai Intézet  
Témavezetők: Prof. Hohmann Judit DSc., Csupor Dezső PhD.

**Roza Orsolya**

***Cyclopia genistoides* és *Hoodia gordonii*,  
két perspektívikus dél-afrikai gyógynövény**

Doktori értekezés tézisei

**Szigorlati Bizottság:**

Elnök: Prof. Dr. Máthé Imre DSc.

Tagok: Dr. Kéry Ágnes PhD., Dr. Kele Zoltán PhD.

**Bíráló bizottság:**

Elnök: Prof. Dr. Soós Gyöngyvér PhD.

Opponensek: Dr. Janicsák Gábor PhD., Dr. Kőszegi Tamás PhD.

Tag: Dr. Molnár Péter DSc.

Szeged, Hungary

2016.

## BEVEZETÉS

A menopauza és az elhízás a legelterjedtebb egészségügy problémák közé tartozik. Az előrejelzések szerint 2030-ra évente körülbelül 47 millió nő fog klimaxon átesni világszerte. Az elhízás járvány méreteket ölt, a világ népességének 65% -a él olyan országban, ahol a túlsúly és az elhízás több embert öl meg, mint az alultápláltság. A krónikus betegségek kezelése kimagaslóan fontos, figyelembe véve az érintett népesség méretét. Az elhízás és a menopauza biztonságos és hatékony kezelése még nem valósult meg, ezért szükség van új utak feltérképezésére terápiájukban. Munkám célja, hogy említett problémák esetén alkalmazható növényi hatóanyagokat vizsgáljak a dél-afrikai növényflórából.

Dél-afrika növényvilága rendkívül különleges. A főköldi flórabirodalom (a hat flórabirodalom közül a legkisebb) Dél-afrika kevesebb mint 4%-át foglalja el, mégis a régió fajainak fele itt található (8550), amelynek 73%-a endemikus faj. Nem meglepő, hogy Dél-afrika népi gyógyászata rendkívül gazdag, ennek keretében mintegy 3000 növényfajt használnak. A *Cyclopia genistoides* és *Hoodia gordonii* azon kevés, kb. 40 őshonos faj közé tartozik, amelyek megtalálhatóak kereskedelmi forgalomban is. Az eddig közölt farmakológiai vizsgálataik és tradicionális felhasználásuk alapján terápiás potenciáluk jelentős, azonban hatásaik és kémiai összetételük kevésbé vizsgált.

A *Cyclopia* fajok (Fabaceae) fermentált föld feletti részéből készült teát hagyományosan köptetőként és erősítőként fogyasztották, de anekdotikus bizonyítékok szerint klimaxos tünetek enyhítésére valamint a tejelválasztás serkentésére is használták. A nemzetség négy fajtát (*C. intermedia* E. Mey., *C. genistoides* (L.) Vent., *C. sessiliflora* Eckl & Zeyh. és *C. subternata* Vogel) világszerte forgalmazzák mézbokortea néven; nevét természetes édes ízének és mézre emlékeztető aromájának köszönheti.

A *Cyclopia* fajok fenolos vegyületek széles körét tartalmazzák, például xantonokat, flavonoidokat és izoflavonokat. Valószínűleg a magas polifenoltartalom felelős a leírt ösztrogényszerű hatásukért. Receptorkötési vizsgálatokban a négy *Cyclopia* faj közül a *C. genistoides* metanolos kivonatai rendelkeztek a legerősebb kötési affinitással mindkét ösztrogénreceptor-altípus (ER) esetén.

A *Hoodia gordonii* (Apocynaceae) a busmanok étvágycsökkentésre használják. Feltételezett hatóanyaga egy oxipregnán-glikozid, a P57, amelynek hatásmechanizmusa még ismeretlen. Néhány *in vivo* kísérlet mellett (vitatott) étvágycsökkentő hatását eddig csak egy klinikai vizsgálatban tesztelték, ahol jelentős vérnyomás- és pulzusszámemelkedés jelentettek.

Figyelembe véve, hogy ezen riasztó mellékhatások számos szimpatomimetikus szintetikus fogyasztószerre jellemzőek, és hogy a *Hoodia* fajok kémiai összetétele nem teljesen feltérképezett, lehetséges hogy nem a pregnán-glikozidok felelősek a közölt mellékhatásokért, illetve a *H. gordonii* étvágycsökkentő hatásáért.

## CÉLKITŰZÉSEK

Munkám célja két dél-afrikai növény tartalomanyagainak elhízás és menopauza kezelésében történő lehetséges használatának feltárása volt.

Ennek érdekében munkám céljál tűztem ki:

- a *Hoodia gordonii* hatásmechanizmusának vizsgálatát, amely valószínűleg a közölt mellékhatásokért is felelős,
- analitikai módszer kifejlesztését a *Hoodia* termék hitelességének bizonyítására,
- a *C. genistoides* hatástanilag követett frakcionálását, fitoösztrogén hatású másodlagos anyagcseretermékek azonosításának céljából,
- vegyületek izolálását a *C. genistoides*ből, különböző kromatográfiás módszerek segítségével (CC, VLC, RPC, MPLC, PLC és HPLC),
- NMR és MS módszerek alkalmazásával az izolált vegyületek szerkezetének meghatározását, az irodalomban közölt NMR-adatok kiegészítését,
- a fermentált és nem fermentált mézbokortea aktív komponenseinek mennyiségi összehasonlítását,
- probiotikus baktériumok *C. genistoides*ből izolált flavonoid glikozidokon kifejtett hatásának tanulmányozását, és ezzel a bél baktérium flórájának lehetséges szerepét a mézbokor flavonoid-glikozidjainak metabolizmusában és aglikonjainak biohasznosulásában,
- a *C. genistoides*ből izolált fitoösztrogének antiproliferatív hatásának vizsgálatát,
- a *C. genistoides*ből izolált vegyületek xantin-oxidáz (XO) inhibitor hatásának értékelését.

## ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

Egy *Hoodia* termék (*Hoodia* spray) és az autentikus növényi anyag összehasonlításához nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC) és nagy teljesítményű vékonyréteg-kromatográfiás eljárást (HPTLC) alkalmaztunk, a vizsgálatokhoz a frissen darált *H. gordonii* ultrahangos furdóban, acetonitrillel készült kivonátat használtuk. A *Hoodia* sprayt módosítás nélkül használtuk ezekben a vizsgálatokban. A termék hamisításának vizsgálatához a *Hoodia* sprayt szintén közvetlenül használtuk vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) és a tömeg-spektroszkópás (MS) elemzéshez. A szervfurdóban végzett vizsgálatokhoz a *Hoodia* sprayt szárazra pároltuk, a maradékot fiziológiás sóoldat és DMSO elegyében (95: 5) feloldottuk, végül szűrtük.

A szárított fermentált és nem fermentált *C. genistoides* föld feletti hajtásából metanolos kivonatot készítettünk, ultrahangos extrakció segítségével. A betöményített kivonatokot vízzel elegyítettük, majd folyadék-folyadék megosztással frakcionálva nyertük az *n*-hexán, diklór-metán, etil-acetát, maradék vizes kivonatokot és az oldhatatlan részt.

A vegyületek tisztítását többlépéses kromatográfiás eljárás segítségével végeztük el, oszlopkromatográfiát (CC), vákuum folyadékkromatográfiát (VLC), rotációs planárokromatográfiát (RPC), közepes nyomású folyadékkromatográfiát (MPLC), preparatív rétegekromatográfiát (PLC), gélszűrést (OCC-SPh) és HPLC-t alkalmazva. Állófázisként normál és fordított fázisú SiO<sub>2</sub>-t (NP/RP), poliamidot vagy Sephadex LH-20 gélt használtunk. Az izolált vegyületek szerkezet-meghatározása különböző spektroszkópiai módszerek (NMR, HRESIMS, APCIMS, ESIMS és UV) segítségével történt.

A vegyületek HPLC-s mennyiségi meghatározásához forró csapvízzel vontuk ki a szárított fermentált és nem fermentált *C. genistoides* („tea”). Összehasonlításként metanolos kivonatot is készült. A bakteriális fermentáció tanulmányozása során a fermentált és nem fermentált *C. genistoides*-ből készült vizes kivonatokot használtunk. Liofilizálás után a száraz maradékot DMSO-ban oldottuk, és fiziológiás sóoldatot és probiotikus baktérium törzsek keverékét adtuk az oldatokhoz. Ezeket a keverékeket 37 °C-on 50 óráig keverünk, majd HPLC-vel elemeztük.

A fermentált és nem fermentált *C. genistoides* diklór-metános és etil-acetátos kivonátának és a belőlük izolált komponensek fitoösztrogén hatását *in vitro*, transzgenikus pER8:GUS rendszerrel tanulmányoztuk.

A *C. genistoides* egyes komponenseinek sejtproliferációt gátló hatását *in vitro* humán sejtvonalakon (A2780 - petefészek karcinóma, T47D - mell karcinóma) vizsgáltuk.

Az izolált vegyületek xantin-oxidáz gátló hatását *in vitro* teszteltük.

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### A *Hoodia* termék szimpatomimetikus hatása

Az egyetlen, *Hoodia gordonii*val végzett humán klinikai vizsgálat nem mutatott változást a betegek testsúlyában vagy energiafelhasználásában, de a vizsgálatoz használt tisztított *H. gordonii* kivonat fogyasztása jelentős vérnyomás- és pulzusszám-emelkedéssel járt. Hasonló mellékhatásokat jelentett egy Magyarországon kapható *Hoodia* termékkel (*Hoodia spray*) kapcsolatban egy fogyasztó. Ebből kifolyólag először a termék *H. gordonii*val való összehasonlítását és lehetséges, szív- és érrendszeri mellékhatásokat okozó vegyületekkel (pl. szibutramin, amfetamin) történő hamisításának vizsgálatát végeztük el. Ezek után, a *Hoodia spray*  $\beta$ -adrenerg receptorokon való hatását patkány méhen teszteltük, hogy kiderítsük a  $\beta$ -adrenerg receptorok lehetséges szerepét a növény kardiovaszkuláris mellékhatásaiban.

### A *Hoodia* termék autentikus növényi anyaggal történő összehasonlítása és hamisításának vizsgálata

Először a *Hoodia gordonii* jellegzetes vegyületét a P57-et, vizsgáltuk tömegspektrometriás módszerrel (többszörös reakció monitorozás, MRM). Mind az  $m/z$  311,3 és  $m/z$  785,5 termékionok detektálhatóak voltak a prekuzok ionnal együtt ( $m/z$  885,5), jelezve, hogy a P57 jelen van a *Hoodia spray*ben. Az aglikon termékionjai is mérhetőek voltak:  $m/z$  319,3 és  $m/z$  337,3. Ezek mind irodalomban közölt átmenetek.

A termék és a *H. gordonii* kivonat kromatogramjai közötti hasonlóság alátámasztotta, hogy a kereskedelmi termék *Hoodia* kivonatot tartalmazott. Szibutramin, amfetamin, metamfetamin vagy efedrin szennyezettség nem volt kimutatható a termékben.

### Béta-adrenerg receptor agonista aktivitás

A  $\beta$ -adrenerg receptor agonisták étvágycsökkentő hatással rendelkeznek, de a  $\beta$ -adrenoceptorok stimulálása különböző szív- és érrendszeri panaszokat is okoz. Mivel ilyen mellékhatásokat jelentettek egy *H. gordonii* kivonattal kapcsolatban, ezért a  $\beta$ -adrenerg receptorok stimulálása racionális magyarázatnak tűnt hatásmechanizmusára. Mind az  $\alpha$ - és  $\beta$ -adrenerg receptorok fontos szerepet töltenek be a méh simaizom motoros aktivitásában, összehúzórást illetve relaxációt kiváltva. *In vitro*, szervfürdőben végzett vizsgálatok során a *Hoodia gordonii* kivonatot tartalmazó termék méhizomzatra kifejtett hatását vizsgáltuk spontán és KCl-stimulált kontrakciók esetén; a kísérlethez nem vemhes és késői vemhes (22. nap) patkányból preparált izomgyűrűket használtunk. Minden kísérlet egy nem szelektív  $\beta$ -antagonista, a propranolol (10  $\mu$ M) jelenlétében vagy jelenléte nélkül történt. A termék jelentős és koncentrációfüggő relaxációt váltott ki mind a

spontán és a stimulált összehúzódások esetén. A spontán kontraktilitás gátlása szignifikánsan csökkent propranolol jelenlétében. A Hoodia spray méhizomzaton kifejtett relaxáló hatása lényegesen kisebb volt késői vemhes állatok esetén, de a propranolol jelentősen módosította azt.

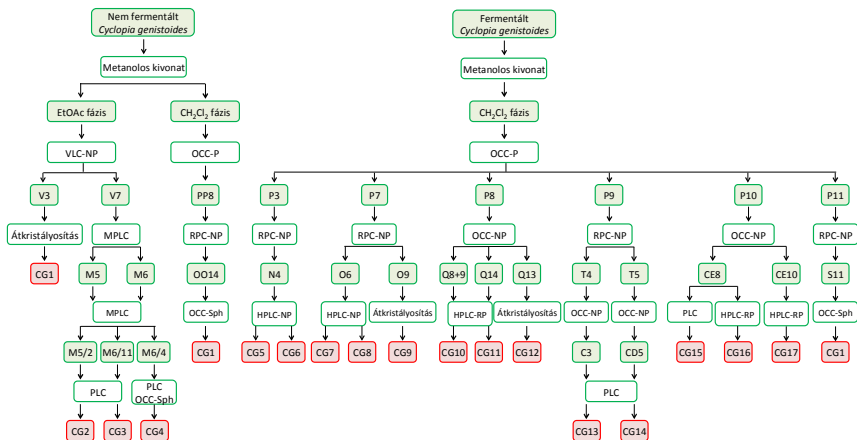
A terhesség alatti receptorfunkció-változás magyarázatul szolgálhat a szimpatomimetikus vegyületek gesztációfüggő méhizomzat-relaxáló hatására (gyengébb méhrelaxáló hatás késői vemhes állatok esetén). A nem vemhes patkány méhe korlátozottan húzódik össze  $\alpha$ -adrenerg hatásra, de hatékonyan elernyed  $\beta$ -adrenerg stimuláció esetén. A késői vemhes myometrium érzékeny mind  $\alpha$ - és  $\beta$ -adrenerg ingerlésre, ezért a méhizomzat válaszreakcióját a vizsgált anyag receptor preferenciája határozza meg. Valószínűsíthető, hogy a termék által kiváltott korlátozott relaxáció késői vemhes myometrium esetén egy kiegyensúlyozott  $\alpha$ - és  $\beta$ -adrenerg stimuláció következménye, amely során fokozott összehúzódás érvényesül, a  $\beta$ -receptorokon keresztül kiváltott hatás elfedésén keresztül.

A termék méhre kifejtett hatásának propranolol-érzékenysége alapján a Hoodia spray szimpatomimetikus hatása valószínűsíthető, amelyben jelentős a  $\beta$ -receptor által mediált komponens. Az eredmények magyarázatot nyújthatnak a klinikai vizsgálatban közölt szív- és érrendszeri mellékhatásokra (vérnyomás és pulzusszám-emelkedés). Mivel a vizsgált *Hoodia* termék rendelkezik szimpatomimetikus hatással, annak használata mind étvágycsökkenést és megnövekedett hőtermelést is okozhat, ami fogyáshoz vezethet.

A mért szimpatomimetikus (jelentős  $\beta$ -receptor által mediált) hatás és az ebből eredő mellékhatások mechanizmusa hasonló, több ma már visszavont fogyasztószeréhez. Ezért, ha egy termék fogyasztó hatást okoz, akkor tartani lehet a közölt mellékhatásoktól.

### **A vegyületek izolálása**

A fermentált és nem fermentált *C. genistoides* diklór-metános fázisának poliamid oszlopkromatográfiás frakcionálásával 14 és 12 főfrakciót nyertünk (P1-P14 és PP1-PP12). A fermentált és nem fermentált *C. genistoides* kivonatok etilacetátos fázisának vákuum folyadékkromatográfiás (szilikagél) elválasztása 12 frakciót eredményezett (V1-V12). Számos frakció mutatott ösztrogénszerű, antiproliferatív vagy xantin-oxidáz gátló hatást, illetve érdekes kémiai összetételt (TLC alapján). Mivel a főfrakciók kémialag komplexnek bizonyultak, ezért többlépcsős kromatográfiás eljárást (RPC, MPLC, PLC, HPLC, CC) alkalmaztunk a tiszta vegyületek izolálására (CG1-CG17) (**1. ábra**). Az izolációs eljárás során szilikagél vagy Sephadex LH-20 állófázisokat, valamint eltérő polaritású és összetételű mozgófázisokat használtunk.



1. Ábra A *C. genistoides* vegyületeinek izolálása

### Az izolált vegyületek szerkezet-meghatározása

Az izolált vegyületek szerkezet-meghatározása spektroszkópiai módszerek segítségével történt. A tömegspektrometriás vizsgálatokkal a molekulatömeget és az összegképletet határoztuk meg. A szerkezet-meghatározáshoz az 1D és 2D NMR spektroszkópia szolgáltatja a legértékesebb adatokat. Az  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, JMOD,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HSQC és HMBC spektrumok alapján levezettük a vegyületek síkbeli szerkezetét, a NOESY korrelációk segítették a relatív konfiguráció meghatározását.

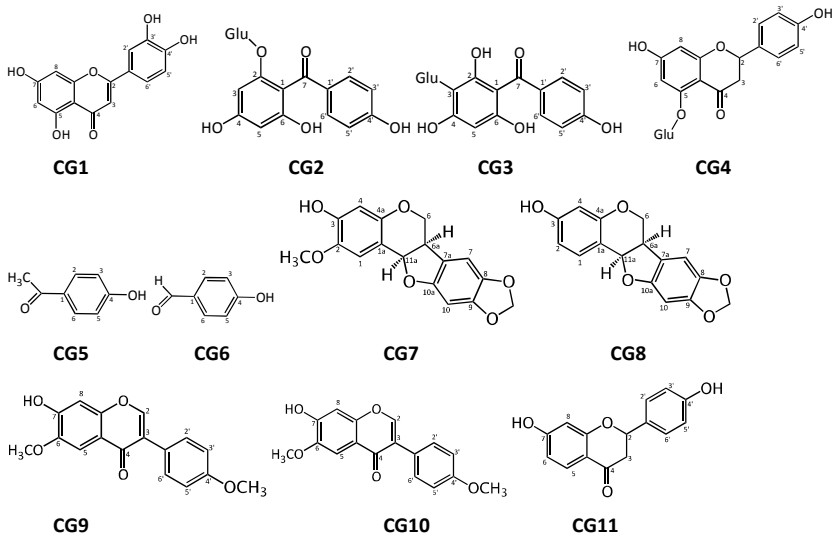
A **CG2**-t és a **CG3**-at spektrális jellemzőik alapján benzofenon-származékokként azonosítottuk. A spektrális adatok irodalomban közölt adatokkal való összehasonlítása alapján a CG2-t iriflofenon 2-O- $\beta$ -glükopiranozid-ként azonosítottuk. A CG3 az iriflofenon 3-C- $\beta$ -glükopiranoziddal azonosnak bizonyult, amit korábban izoláltak már a *C. genistoides*ből és a *C. subternataból*.

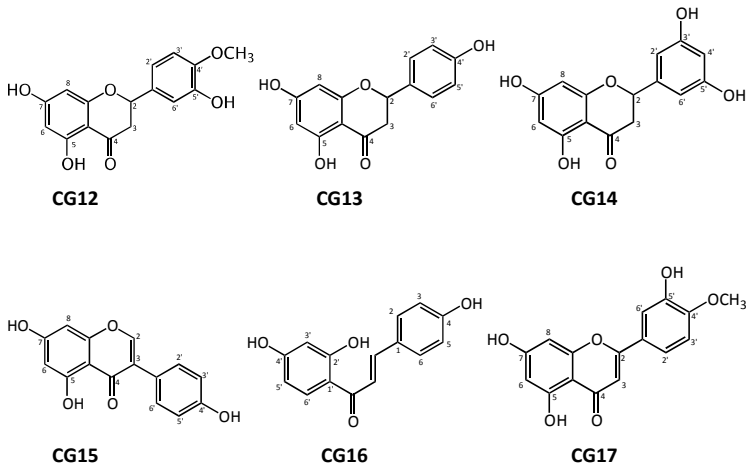
A **CG7** és **CG8** esetében egy metiléndioxi-, hidroxil- és metoxicsoporttal szubsztituált pterokarpán magot találtuk. Részletes MS és NMR vizsgálatok után a CG8-at (6aR,11aR)-(-)-maackiainként, a CG7-et (6aR,11aR)-(-)-2-methoxymaackiainként azonosítottuk. Mindkét vegyület esetén még nem publikált  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  adatokat két-dimenziós NMR vizsgálatok segítségével (beleértve  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, NOESY, HSQC és HMBC kísérleteket) nyertünk. A 2-metoxymaackiaint és a maackiaint elsőként izoláltuk a *Cyclopia* nemzetségből. Korábban ezeket a vegyületek *Ulex* és más Fabaceae fajokból írták le.



A további vegyületeket az irodalomban közölt spektroszkópiai és fizikai jellemzők alapján azonosítottuk: luteolin (**CG1**), naringenin 5-O- $\beta$ -glükozid (= helikrizin B) (**CG4**), afrormozin (**CG9**), formononetin (**CG10**), likviritigenin (**CG11**), naringenin (**CG13**), 5,7,3',5'-tetrahydroxiflavánon (**CG14**), genisztein (**CG15**), izolikviritigenin (**CG16**) és diozmetin (**CG17**). A **CG5**-ot piceolként (= 4-hidroxiacetofenon) és a **CG6**-ot 4-hidroxibenzaldehidként határoztuk meg,  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR és MS méréseink alapján. A heszperetin (**CG12**)  $^1\text{H}$ - és  $^{13}\text{C}$ -NMR adatok jó egyezést muttak az irodalommal, de DMSO- $d_6$ -ban felvett mérést első alkalommal végeztünk.

A *Cyclopia genistoides* (nagyreszt hatástanilag követett) frakcionálása 17 vegyület izolálásához vezetett. Tizennégy vegyületet először izoláltuk ebből a fajból [(iriflofenon 2-O- $\beta$ -glükopiranozid) (**CG2**), helikrizin B (**CG4**), piceol (**CG5**), 4-hidroxibenzaldehid (**CG6**), (-)-2-metoximaackiain (**CG7**), (-)-maackiain (**CG8**), afrormozin (**CG9**), formononetin (**CG10**), likviritigenin (**CG11**), naringenin (**CG13**), 5,7,3',5'-tetrahydroxiflavánon (**CG14**), genisztein (**CG15**), izolikviritigenin (**CG16**), diozmetin (**CG17**)] és tíz komponenst pedig a *Cyclopia* nemzetségből [iriflofenon 2-O- $\beta$ -glükopiranozid (**CG2**), helikrizin B (**CG4**), piceol (**CG5**), 4-hidroxibenzaldehid (**CG6**), (-)-2-metoximaackiain (**CG7**), (-)-maackiain (**CG8**), likviritigenin (**CG11**), 5,7,3',5'-tetrahydroxiflavánon (**CG14**), genisztein (**CG15**) és izolikviritigenin (**CG16**)]. Érdekes, hogy a naringenin nagy mennyiségben volt jelen a növényben, annak ellenére, hogy két vizsgálatban is azt közölték, hogy HPLC-meghatározással nem volt kimutatható. A genisztein is megtalálható a *C. genistoides*-ben, amelyet rendszerint pozitív referenciaként használnak fitoössztrógen vizsgálatokban.





### Ösztrogénszerű aktivitás

A fermentált és nem fermentált *C. genistoides* metanolos kivonatait egy nagyon hatékony transzgenikus növényi rendszerrel, az *Arabidopsis thaliana* pER8:GUS-al vizsgáltunk, hogy felderítsük ösztrogén/antiösztrogén hatásukat. A transzgenikus növény pER8:GUS, képes érzékelni az ER-agonistákat és antagonistákat is, és a fitoösztrogének bioaktivitásának kvantitatív meghatározására is lehet használni. A rendszer tartalmaz egy aktivátor egységet, ami egy ösztrogénreceptor-alapú transzaktivátor vektor (XVE), és egy hÍrvivőt, a GUS ( $\beta$ -glükuronidáz) gént. Az XVE aktivátor az ER- $\alpha$  szabályzó régióját tartalmazza, ezért csak ER- $\alpha$  kölcsönhatások meghatározására képes. Működése az ösztradiol által szigorúan szabályozott, ösztrogénaktív vegyületek jelenlétében az aktivátor stimulálja a GUS transzkripciót. Az elsődleges eredmények vizuálisan is könnyen megfigyelhetők, hiszen a GUS fehérje tartalmú transzgenikus növények kék színűek lesznek, ha egy glükopiranozid-uronsavat tartalmazó festéket adunk hozzá.

A *Cyclopia genistoides* fermentált és nem fermentált föld feletti részének metanolos kivonataiból folyadék-folyadék megosztással nyert *n*-hexános, etil-acetátos, diklór-metános és vizes metanolos fázisokat transzgenikus növényi pER8:GUS rendszerben mértük, 100 és 200  $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációban. A kivonatok ösztrogénszerű hatását hisztokémiai vizsgálattal (GUS-aktivitás mérése) detektáltuk. A fermentált és nem fermentált *C. genistoides*  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  és etil-acetátos fázisai bizonyult aktívnak, így ezeket választottuk hatástanilag követett izolálás céljára, amelyet HPLC, MPLC, VLC, RPC, CC és PLC segítségével végeztünk. A fermentált növényi anyag  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  frakciójának tizennégy, poliamid oszlopkromatográfiás útján nyert alfrakciója közül négy

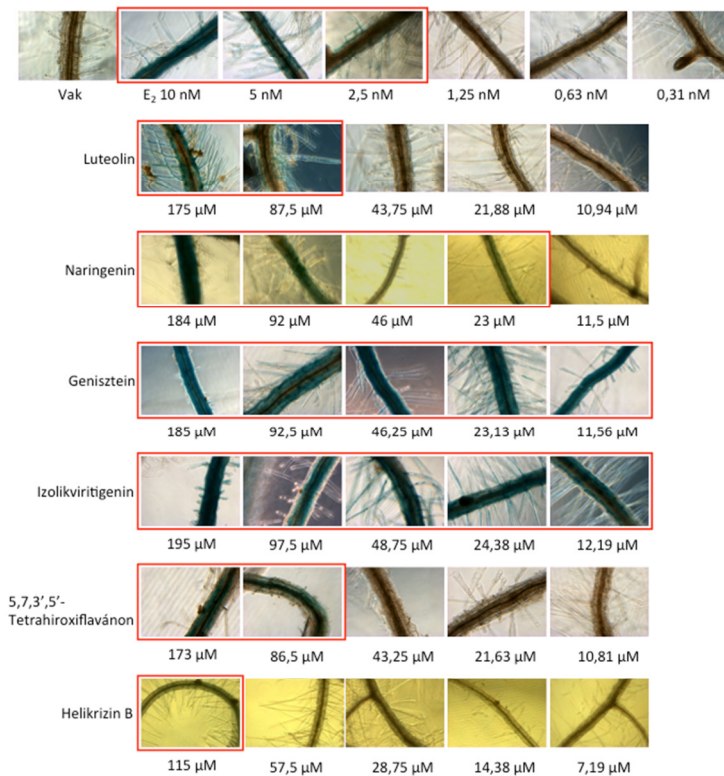
mutatott ösztrogénszerű hatást (P8-P11, MAC  $\leq$  200  $\mu\text{g/ml}$ ). A P9-es frakcióból a CG13 és CG14, a P10-ból a CG15, CG16 és a P11-ből a CG1 jelzésű aktív vegyületeket nyertük (**1. ábra**). A P8-as és P10-es frakciókat HPLC-vel is analizáltuk, és a CG13 illetve CG14 ezekben is detektálható volt. A nem fermentált *C. genistoides* EtOAc frakciójának tizenkét VLC szubfrakciójából négy mutatkozott aktívna a pER8:GUS rendszerben (V2, V3, V6, V7, MAC  $\leq$  200  $\mu\text{g/ml}$ ). A V3-as és V7-es aktív frakcióból nyertük a szintén aktív CG1-et illetve CG4-et. A V2-es és V3-as aktív frakciókat is megvizsgáltuk HPLC-vel, és míg a V2-ben a CG13 és CG14, addig a V3-ban a CG14 volt detektálható.

Végeredményben a biológiai aktivitásméréssel követett kromatográfiás frakcionálás hat, ösztrogénaktivással rendelkező flavonoid izolálásához vezetett: CG1, CG4, CG13, CG14, CG15 és CG16 (luteolin, helikrizin B (naringenin-5-O- $\beta$ -glükozid), naringenin, 5,7,3',5'-tetrahydroxiflavonon, genisztein és izolikviritigenin).

A legkevésbé hatásos vegyület, a helikrizin B volt 115  $\mu\text{M}$  minimálisan hatékony koncentrációval (MAC) (**2. ábra**). A *C. genistoides*ből korábban nem izolált két vegyület, a genisztein és az izolikviritigenin is jelentős hatást mutatott (MAC  $<11,56$  illetve 12,19  $\mu\text{M}$ ). A luteolin (MAC 87,5  $\mu\text{M}$ ), naringenin (MAC 23  $\mu\text{M}$ ) és 5,7,3',5'-tetrahydroxiflavonon (MAC 86,5  $\mu\text{M}$ ) szintén rendelkezett ösztrogénszerű hatással. A referenciaként használt ösztradiol ( $\text{E}_2$ ) MAC-értéke 2,5 nM volt.

A luteolin, genisztein, izolikviritigenin és naringenin széles körben ismert fitoösztrogének. Egy vizsgálatban a genisztein (54 mg/nap) pozitív hatással volt a csontsűrűsége oszteopéniás posztmenopauzában. Az izolikviritigenin is ígéretesnek bizonyult csontleépüléssel járó betegségek esetén. A genisztein és luteolin elnyomta a környezeti ösztrogének proliferációs-stimuláló indukcióját *in vitro*, ami arra utalhat, hogy anti-ösztrogén és rákellenes hatással rendelkezhetnek; a naringenin pedig nőstény egerekben képes volt enyhíteni ovariektómiával társult metabolikus zavarokat. A későbbi preparatív munka során, további jól ismert fitoösztrogéneket izoláltunk a fermentált növényi anyag metanolos kivonatának  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -os megosztása után: diozmetint, afromozint, likviritigenint (egy szelektív ER- $\beta$  antagonist) és formononetint (nagyobb ER- $\beta$  affinitás). A heszperetint, az egyik leghatásosabb természetes aromatózátgátlót is izoláltuk.

Ezen fitoösztrogének jelenléte tudományos magyarázatot nyújt a mézbokortea hagyományos használatára klimaxos tünetek esetén. Azonban a szakirodalomban különböző *Cyclopia* fajok különböző kivonatai eltérő fitoösztrogén-aktivitást mutattak (sokszor még ugyanazon faj különböző mintái is), ami megnehezíti a mézbokortea célzott alkalmazását ilyen céllal.



**2. Ábra** Az izolált vegyületek minimálisan hatékony koncentrációi a hisztokémiai tesztben. Azon koncentrációk ahol a kék szín detektálható volt, pirosan be vannak keretezve, mutattva az ösztrogén aktivitását. Azt a koncentrációt tekintettük minimálisan aktív koncentrációnak, ahol a kék szín még látszott. E<sub>2</sub>: ösztrodial

### Az ösztrogénszerű aktivitással rendelkező vegyületek mennyiségi meghatározása HPLC-vel és a fermentálás fitokémiai vonatkozásai

A hat, ösztrogénszerű aktivitással rendelkező vegyület kvantitatív összehasonlítását a fermentált és nem fermentált *C. genistoides* között RP-HPLC-vel végeztük. A csúcsok azonosításához az izolált vegyületek retenciós időit és UV-vis spektrumait (PDA detektor) használtuk.

Bár mind a fermentált és nem fermentált növény hasonló mennyiségű luteolint és izolikviritingent tartalmazott, a fermentált mézbokor naringenin és 5,7,3',5'-tetrahydroxiflavánon

tartalma 30-szoros illetve 10-szeres volt. Másfelől, a nem fermentált *Cyclopia* a hat aktív vegyület közül a legkisebb ösztrogénszerű hatással rendelkező naringenin-glikozidot tartalmazta nagyobb mennyiségben.

A hatástanilag-követett izoláláshoz használt metanolos és a hagyományosan használt vizes kivonat („tea”) kvantitatív összehasonlítását is elvégeztünk. A forró csapvízzel készített „tea” sokkal kisebb koncentrációban tartalmazta az aktív vegyületeket. Az izolikviritigenin a kimutatási határ alatt volt a vizes kivonatokban, míg a 5,7,3',5'-tetrahidroxiflavánon csak a nem fermentált növény vizes kivonatában nem volt észlelhető. A genisztein sem a metanolos, sem a vizes mintákban nem volt kimutatható.

A fermentálás csökkenti a *Cyclopia* spp. fenolosanyag-tartalmát, hagyományosan azonban a fermentált teát fogyasztják. A fermentációs eljárás során a flavonoid-glikozidok elbomlása megmagyarázhatja a különbséget a fermentált és nem fermentált növényben mért hatóanyag-mennyiségek között. Bár kísérleteink során ismert fitoösztrogéneket mutatunk ki a *C. genistoides*ből, a vizsgált vegyületek alacsony koncentrációja megkérdőjelezi a hagyományosan használt mézbokor főzet klinikailag jelentős fitoösztrogén-aktivitását a humán szervezetben.

Mindezek ellenére, egy vizsgálatban mind a nem fermentált, mind a fermentált *C. genistoides* és *C. subternata* vizes kivonatai képesek voltak szignifikánsan kiszorítani 1 nM [<sup>3</sup>H]-E<sub>2</sub> az hERβ-ról. Igaz, hogy nem minden mintában volt megfigyelhető ez a hatás, de rámutatott arra, hogy vizes kivonatoknak is lehet ösztrogénszerű hatása. A *Cyclopia* kivonatok ösztrogénaktivitása különböző polifenolok finom egyensúlyából ered, amelyek különböző mennyiségekben vannak jelen és eltérő erősségű ösztrogénhatással rendelkeznek.

Egy másik kísérletben a bélflóra lehetséges hatását vizsgáltuk a fermentált és nem fermentált *C. genistoides* vizes kivonatain. A méréshez egy kereskedelembe kapható probiotikus baktériumkeveréket használtunk. A vizes kivonatok naringenin- és luteolintartalmát HPLC-vel mértük meg, bakteriális fermentáció előtt és után. Mind a feldolgozott, mind a zöld növény hasonló mennyiségű luteolint tartalmazott, de a naringenin mennyisége a fermentált mézbokorban több volt. Ennek ellenére 50 óra bakteriális fermentálás hatására, valószínűleg a cukorcsoport elvesztése miatt, a naringenin és luteolin tartalma közti különbség eltűnt.

A hagyományos fermentációs eljárás (magas hőmérsékletű oxidáció) csökkenti a *Cyclopia* fajok teljes polifenoltartalmát, de eredményeink szerint a bakteriális fermentáció növelheti az aglikonok mennyiségét, amelyek általában kifejezettebb bioaktivással, valamint jobb biohasznosulással rendelkeznek, mint a megfelelő glikozidok.

### **Antiproliferatív hatás**

Az izolált vegyületek antiproliferatív vizsgálatát T47D (ER-pozitív) és A2780 (ER-negatív) humán daganatsejteken végeztük.

Míg a pER8: GUS tesztben a P8-11, V2, V3, V6 és V7 mutattak ösztrogénszerű aktivitást; az antiproliferatív tesztelés során a P8-as, P10-es, P11-es és a V3-as frakciók gátlása volt 30%-nál nagyobb valamelyik sejtvonalon. A helikrizin B és a 5,7,3',5'-tetrahydroxiflavonon kivételével minden vegyület, amelynél észlelhető volt ösztrogénszerű aktivitás (naringenin, luteolin, izolikvirigenin, genisztein) jelentős antiproliferatív aktivitást is mutatott a tesztelt sejtvonalakon. Mind a négy, antiproliferatív hatással rendelkező vegyület gátlása nagyobb volt az ER-negatív A2780 sejtvonalon, amely ER-független sejtproliferáció-gátlásra utalhat, vagy esetleg sejtproliferáció serkentésére az ER-pozitív T47D sejtvonalon; ami szintén ösztrogénaktivitásukat támaszthatja alá.

### **Xantin-oxidáz gátló hatás**

A fermentált és a nem fermentált növényi anyag metanolos kivonatainak diklór-metános megosztásával nyert fázis xantin-oxidáz gátló aktivitást fejtett ki, ezért további kromatográfias tisztításnak vetettük alá. A nem fermentált *Cyclopiá*ból származó PP8-as és a fermentált növényből nyert P10-es frakciók fejtették ki a legerősebb xantin-oxidáz gátlást. Ezen frakciók további tisztítása vezetett a luteolin és diozmetin (CG1 és CG17) izolálásához, amely vegyületek figyelemreméltó XO gátló hatást mutattak: luteolin  $IC_{50}$ : 0,84  $\mu$ M (95%-os konfidencia-intervallum 0,80-0,91  $\mu$ M) és diozmetin  $IC_{50}$ : 0,53  $\mu$ M (95%-os konfidencia-intervallum 0,40-0,80  $\mu$ M). Mindkét vegyület jelentősen meghaladta az allopurinol által kifejtett gátlást ( $IC_{50}$  = 7,49  $\pm$  0,29  $\mu$ M), amelyet pozitív kontrollként alkalmaztunk.

A hatástanilag követett izolálás mellett az összes általunk izolált vegyületet is megmértük. A 15, már izolált komponens közül csak két, szerkezetileg egymáshoz közel álló flavánon, a heszperetin (CG12) és az 5,7,3',5'-tetrahydroxiflavonon (CG14) mutatott gyenge gátlást ( $IC_{50}$  = 55,20 nM (95%-os konfidenciaintervallum 41,40-73,51  $\mu$ M) és 120,55  $\mu$ M (95%-os konfidencia-intervallum 101,71-142,86  $\mu$ M). A többi izolált vegyület nem fejtett ki xantin-oxidáz gátló hatást ( $IC_{50}$  > 150).

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni köszönetemet a Farmakognóziai Intézet csodálatos csapatának, akik mindvégig támogattak és olyan légkört teremtettek, amely mindig a legtöbbet hozta ki belőlem. Különösen hálás vagyok témavezetőmnek, **Dr. Csupor Dezső**nek, akire mindig számíthattam, napszaktól függetlenül. Ösztönzése és szakmai tanácsai felbecsülhetetlen hozzájárulást nyújtottak munkámhoz.

Őszinte köszönetem fejezem ki **Prof. Dr. Hohmann Judit**nak, munkám irányításáért és folyamatos támogatásáért. Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Veres Katalinnak** és **Dr. Rédei Dórá**nak, akik bevezettek a kutatás világába és inspiráltak, hogy elkezdjem PhD munkámat. Köszönet illeti **Dr. Vasas Andreát**, akitől tudományos útmutatást és sok mást kaptam.

Hatalmas köszönet szeretnék mondani **Dr. Ana Martins**nak, aki helyszíntől függetlenül sokszor segítségemre sietett.

Hálás vagyok **Prof. Szendrei Kálmán**nak és **Dr. Hunyadi Attilán**ak, a sok ötletért, amellyel munkámat inspirálták. Köszönöm **Dr. Jacobus N. Eloff**nak a növényi anyag begyűjtését.

Külön köszönettel tartozom **Dr. Lajter Ildikó**nak, aki a jobb kezem volt (és én neki a bal).

Meg szeretném köszönni, hogy **Prof. Fang-Rong Chang**, lehetővé tette, hogy kutatásom nagy részét az Ő laboratóriumában végezhettem és **Dr. Wan-Chun Lai**nak, aki új technikákat tanított, és támogatására mindig számíthattam. Köszönettel tartozom az Európai Unió és a Magyar Állam (TÁMOP-4.2.4.A/ 2-11/1-2012-0001) 'Nemzeti Kiválóság Proram'-jának az anyagi támogatásáért.

Köszönöm az inspirációt **Kozma Eszter**nek, ami nélkül soha nem kezdtem volna el a PhD-m.

**Dr. Jedlinszki Nikolett**, **Dr. Kele Zoltán**, **Kúsz Norbert** és **Dankó Balázs** nélkül az NMR és MS mérések nem valósultak volna meg, köszönöm magas szintű szakmai munkájukat.

Hálával tartozom **Dr. Ványolós Attilán**ak akinek bizalma munkám iránt kiemelkedő volt.

Szívből köszönöm **Dr. Borcsa Botond Lajos** és **Dr. Vajda Szilárd** bátorítását a nehéz időkben. Köszönetem fejezem ki **Dr. Zupkó Istvánnak** és **Dr. Lovász Norbert**nek az antiproliferatív és a szervfürdős vizsgálatok elvégzéséért. Rendkívül hálás vagyok **Hadárné Berta Erzsébet**nek, **Herkéné Nagy Annának** és **Hevérné Herke Ibolyának** az értékes segítségért, a sok nevetésért és a kiváló technikai támogatásért. Szeretnék köszönetet mondani barátaimnak, **Horváth Attilán**ak és **Boros Klárának**, a kitartó támogatásukért a HPLC mérésekben és azon túl.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni **Istennem**nek, hogy utat mutatott, kedvesemnek, **Ed**nek szeretetétét és támogatását, továbbá **családom**nak és **barátaim**nak, életem sarokköveinek, akik felbecsülhetetlen segítséget nyújtottak, számtalan úton s módon.

#### AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:

1. **Roza O**, Lai W-C, Zupkó I, Hohmann J, Eloff JN, Chang F-R, Csupor D.  
Bioactivity guided isolation of phytoestrogenic compounds from *Cyclopia genistoides* by pER8:GUS reporter system  
*South African Journal of Botany* 2016; *Nyomtatás alatt* If: 1,244 (2015)
2. **Roza O**, Martins A, Hohmann J, Lai W-C, Eloff JN, Chang F-R, Csupor D.  
Flavonoids from *Cyclopia genistoides* and their xanthine oxidase inhibitor activity  
*Planta Medica* 2016; **82**:1274-1278 If: 2,152 (2015)
3. **Roza O**, Lovász N, Zupkó I, Hohmann J, Csupor D.  
Sympathomimetic Activity of a *Hoodia gordonii* Product: A Possible Mechanism of Cardiovascular Side Effects  
*BioMed Research International* 2013; Article ID: 171059 If: 2,706

#### ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK:

1. **Roza O**, Martins A, Hohmann J, Lai W-C, Chang F-R, Eloff JN, Csupor D.  
Polyphenols from *Cyclopia genistoides* and their xanthine oxidase inhibitory activity  
63<sup>rd</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research – GA2015; Budapest, Magyarország, 2015. augusztus 23-27.
2. Csupor D., **Roza O.**, Jedlinszki N., Hohmann J.  
Szintetikus hatóanyagokkal hamisított növényi fogyasztószerek vizsgálata  
Congressus Pharmaceuticus Hungaricus; Budapest, Magyarország, 2014. április 10-12.
3. **Roza O.**, Martins A, Csupor D, Hohmann J.  
A *Cyclopia genistoides* xantin-oxidáz gátló hatásának vizsgálata  
Fiatal Gyógynövénykutatók Fóruma; Budakalász, 2014. február 14.
4. **Roza O**, Lai W-C, Chang F-R., Boros K, Csupor D.  
Investigation of the phytoestrogenic activity of *Cyclopia genistoides* by pER8:GUS reporter system  
62<sup>nd</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research – GA2014; Guimaraes, Portugália, 2014. augusztus 31-szeptember 4.
5. **Roza O**, Lovász N, Zupkó I, Hohmann J, Csupor D.  
*Hoodia gordonii*: facts beyond beliefs  
Trends in natural products research: a young scientists meeting of PSE and ÖPhG; Obergurgl, Ausztria, 2013. július 21-25.