

A Citrus trifoliata és a Foeniculum vulgare
limonoidjainak és kumarinszármazékainak
vizsgálata

Doktori értekezés tézisei

Dr. Kerekes Diána

Farmakognóziai Intézet
Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2023

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Farmakognózia Doktori Program
Programvezető: Prof. Hohmann Judit DSc
Farmakognóziai Intézet

Témavezető:
Dr. Csupor Dezső DSc

A Citrus trifoliata és a Foeniculum vulgare
limonoidjainak és kumarinszármazékainak
vizsgálata

Doktori értekezés tézisei

Dr. Kerekes Diána

Szigorlati Bizottság:

Elnök: Prof. Hohmann Judit DSc
Tagok: Dr. Janicsák Gábor PhD, Dr. Tóth Barbara PhD

Bíráló Bizottság:

Elnök: Prof. Ilisz István DSc
Opponensek: Dr. Könczöl Árpád PhD, Dr. Gampe Nóra PhD
Titkár: Dr. Katona Gábor PhD
Tag: Dr. Doró Péter PhD

Szeged

2023

BEVEZETÉS

A farmakognózia egyik legfontosabb területe a növényi anyagcseretermékek tanulmányozása. A fitokémiai elemzések alap- vagy alkalmazott kutatási projektek részét is képezhetik, lehetnek kvalitatív vagy kvantitatív vizsgálatok, fókuszálhatnak különböző hatóanyagok és nemkívánatos vegyületek azonosítására vagy mennyiségi meghatározására is.

Bizonyos vegyületcsoportok rendkívüli figyelmet érdemelnek, különösen azok, amelyeknek újonnan felfedezett bioaktivitásai összefüggésbe hozhatók a terápiás alkalmazhatóságukkal vagy a biztonságosságukkal. Az ilyen vegyületek közé tartoznak például a limonoidok, amelyek a citrusfélékben fordulnak elő, valamint a furokumarinok, amelyek különféle élelmiszernövényekben (például az édesköményben) található meg. Míg a limonoidok jól ismertek az antibakteriális és antiproliferatív hatásaikról, addig utóbbi vegyületcsalád tagjai - a rákos sejtekre gyakorolt jótékony hatásuk mellett – káros hatásokkal is rendelkeznek. Számos kutatás bizonyítja, hogy a furokumarinok toxikus hatásokkal bírnak, amelyek közül a leggyakoribb a fototoxicitás. A lehetséges toxikus hatások miatt az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) korlátozza egyes furokumarintartalmú növények használatát, különösen terhesség esetén és gyermekkorban. A fényérzékenyítő hatás ugyanakkor hasznos is lehet: gyógyászati célokra is hasznosítják a PUVA-terápiában.

Az édeskömény termését széles körben használják különféle gyomor-bélrendszeri tünetek kezelésére, még gyermekeknél és csecsemőknél is, valamint galaktogóg szerként is alkalmazzák. Leggyakrabban tea formájában fogyasztják. Bár köztudott, hogy az édeskömény termése furokumarinokat tartalmaz, a biztonságosság racionális értékelése problematikus a furokumarintartalomra vonatkozó átfogó információk hiánya miatt. Kutatásunk egyik célja az volt, hogy mennyiségi meghatározást végezzünk különböző édeskömény-minták furokumarintartalmára vonatkozóan, annak érdekében, hogy releváns információkat nyújthassunk a kockázatértékeléshez, figyelembe véve az összes lehetséges elméleti kockázatot, amely a furokumarintartalmú növény fogyasztásával kapcsolatos.

A *Citrus trifoliatát* a keleti orvoslásban különböző ráktípusok kezelésére használják. Emellett a termést gyulladáscsökkentőként, vérhas, gyomorhurut, valamint gyomor- és bélrendszeri fekélyek kezelésére is alkalmazzák az ázsiai tradicionális gyógyászatban. A gyógyászati használattal összefüggésbe hozható bioaktivitásokat számos kísérleti adat is alátámasztja. Aktivált humán hízósejtekben a termés kivonata csökkentette a gyulladást elősegítő citokinek expresszióját. *In vitro* tesztek során bebizonyították, hogy a növény kivonatai daganatellenes

hatással bírnak különböző rákos sejtvonalakkal szemben. Ezek a hatások összefüggésbe hozhatók a termés furokumarin- és limonoidtartalmával, azonban nem zárható ki, hogy más típusú vegyületek is szerepet játszhatnak a citotoxikus és antiproliferatív hatásban. Munkánk célja az volt, hogy szisztematikusan megvizsgáljuk a *Citrus trifoliata* héjának és magjának kémiai összetételét, különös tekintettel a furokumarinokra és a limonoidokra, beleértve a vegyületek azon bioaktivitásait, amelyek összefüggésbe hozhatók a növény feltételezett rákellenes hatásaival.

Az értekezésben összefoglalásra kerülnek a *Foeniculum vulgare* és a *Citrus trifoliata* növényeken végzett fitokémiai és farmakológiai vizsgálataink. Bár az alkalmazott tudományos módszerek és megközelítések változatosak, a kutatás fő célja – nevezetesen a növényi metabolitok mennyiségi meghatározása, izolálása és bioaktivitásuk értékelése – az, hogy az eredmények hozzájáruljanak az élelmiszer- és gyógynövények racionális és biztonságos felhasználásához.

CÉLKITŰZÉS

Jelen munka célja volt:

- szakirodalom áttekintése a *Foeniculum vulgare* és a *Citrus trifoliata* növények botanikai, fitokémiai és farmakológiai tulajdonságai szempontjából,
- különböző édeskömény minták furokumarintartalmának mennyiségi meghatározása kromatográfias módszerrel,
- *Citrus trifoliata* magjából és héjából kivonat készítése,
- limonoidok és kumarinok izolálása a *Citrus trifoliata* magjából és héjából különböző kromatográfias módszerek alkalmazásával,
- az izolált vegyületek bioaktivitásának vizsgálata.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A *Foeniculum vulgare* minták furokumarin-tartalmának meghatározásához összesen 33 mintát használtunk fel a *F. vulgare* Mill. subsp. *vulgare* var. *vulgare* érett terméséből, amelyek a Szent István Egyetem Gyógy- és Aromanövények Tanszék Génbankjának gyűjteményéből származtak. A vizsgált keserű édeskömény minták között voltak ismeretlen eredetűek, termesztett és vadon termő populációk, korábbi termesztési kísérletekből származó minták és három nyilvántartott változat is (Berfena, Großfrüchtig és Soroksári).

A mintaelőkészítés optimalizálása során a leghatékonyabbnak bizonyult oldószert, az acetonitrilt használtuk az extrakcióhoz. 0,5000 g darált terméshez 5,00 ml acetonitrilt használtunk kivonószerként. Az extraktumok szűrésre kerültek 0,45 µM politetrafluor-etilén (PTFE) fecskendőszűrőn. Az édeskömény kivonatokban három furokumarin – pszoralén, 5-metoxi-pszoralén és imperatorin – mennyiségi meghatározását LC-MS módszerrel végeztük. Az elválasztást Kinetex[®] (2,6 µm C18 100 Å, 100 x 2,1 mm) oszlopon végeztük, eluensként pedig vizet és acetonitrilt használtunk, amelyek 0,1% hangyasavat tartalmaztak. A mérést egy Shimadzu HPLC rendszeren (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japán) végeztük, amely LC-20AD pumpából, DGU-20A5R gáztalanítóból, SIL-20ACH automatikus mintaadagolóból (21 °C-on temperált), CTO-20AC oszloptermosztátból, SPD-M20A PDA-detektorból és AB Sciex API 2000 tripla kvadrupol tömegspektrométerből (AB Sciex LLC, Redwood City, USA) állt. A furokumarinokat a rájuk jellemző tömeg és specifikus fragmensionok alapján azonosítottuk SRM (Single Reaction Monitoring) módban.

A *Citrus trifoliata* L. magjait és héját 2018-ban Borcsa Botond Lajos gyűjtötte Magyarországon, Tompán. Feldolgozás előtt a magokat és a héjakat szobahőmérsékleten szárítottuk. Darálást követően a kivonás szobahőmérsékleten, ultrahangos fürdőn történt metanollal 15 percen keresztül, majd a kivonószer csökkentett nyomáson történő elpárologtatása után kaptuk meg a nyers kivonatot. A kumarinokat, furokumarinokat és a limonoidokat többlépéses kromatográfiás eljárások – oszlopkromatográfia, közepes nyomású folyadék kromatográfia, preparatív rétegekromatográfia, nagy nyomású folyadékkromatográfia, flash-kromatográfia – alkalmazásával izoláltuk a magból és a héjból. Az izolált vegyületek azonosítása mágneses magrezonancia-spektroszkópia (NMR) segítségével történt.

Az izolált vegyületek antiproliferatív és citotoxikus hatásainak vizsgálata során doxorubicin-érzékeny COLO 205 és multidrogr-rezisztens COLO 320 vastagbél adenokarcinóma sejteket

használtunk. Checkerboard microplate módszert alkalmazva vizsgáltuk az izolált vegyületek és a doxorubicin közötti kölcsönhatásokat multidrog-rezisztens COLO 320 (ABCB1 transzportert túltermelő) vastagbél adenokarcinóma sejteken. A sejtnövekedést gátló dózist (ED₅₀) CompuSyn szoftverrel (ComboSyn, Inc., USA) számítottuk ki.

A Pgp-gátlás mértékét rodamin 123 akkumulációs vizsgálat segítségével elemeztük. Pozitív kontrollként tariquidart használtunk 0,2 µM koncentrációban, az alapvonal beállításához pedig kezeletlen sejtek fluoreszcenciáját használtuk. A kísérlet során a sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitását határoztuk meg, és kiszámoltuk a FAR értéket (fluorescence activity ratio).

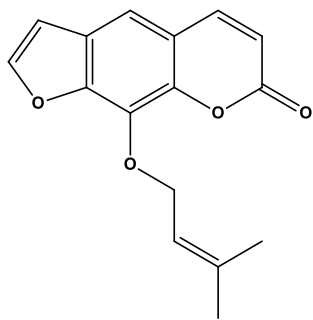
CLARIOstar Plus plate readert (BMG Labtech, Egyesült Királyság) használtunk a vizsgált vegyületek etídium-bromid (EB) felhalmozódására gyakorolt hatásának mérésére, *Staphylococcus aureus* ATCC és *Escherichia coli* AG100 törzsek alkalmazásával. Az EB-akkumulációs vizsgálat utolsó időpontjában kiszámítottuk a relatív fluoreszcencia indexet (RFI). A *S. aureus* esetében pozitív kontrollként reszerpint (25 µM), az *E. coli* esetében pedig CCCP-t használtunk 50 µM-es koncentrációban. Negatív kontrollként csak az EB-oldatot és a baktériumokat használtunk.

EREDMÉNYEK

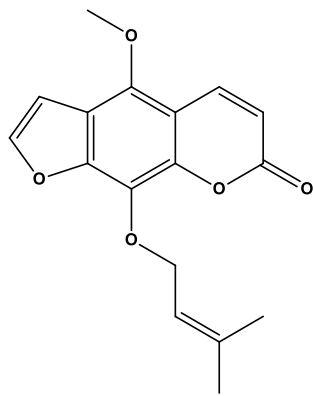
A *C. trifoliata* magjából és héjából izolált vegyületek

A növényi kivonatok különböző kromatográfiás tisztításával négy tiszta vegyületet (**A, E, I, J**) izoláltunk a magból és hat vegyületet (**B-D, F-H**) a *Citrus trifoliata* héjából. A vegyületek szerkezetmeghatározását NMR spektroszkópiával végeztük [1D (¹H, ¹³C JMOD), 2D (HSQC, HMBC, ¹H-¹H COSY, és NOESY)]

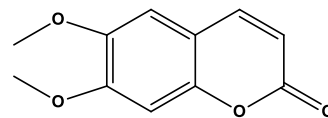
Az izolált vegyületeket a mért spektrális adatok és szakirodalmi adatok összevetésével azonosítottuk: imperatorin (**A**), fellopterin (**B**), szkoparon (6,7-dimetoxi-kumarin **C**), mirzellin (**D**), auraptén (**E**), trifaziol (**F**), umbelliferon (**G**), citroptén (5,7-dimetoxi-kumarin, **H**), limonin (**I**), és dezacetil-nomilin (**J**). Az izolált vegyületek furokumarinok (**A, B**), kumarinok (**C-H**), és limonoidszármazékok (**I, J**). A szkoparon kivételével minden vegyületet korábban leírtak a *Citrus trifoliata*tól.



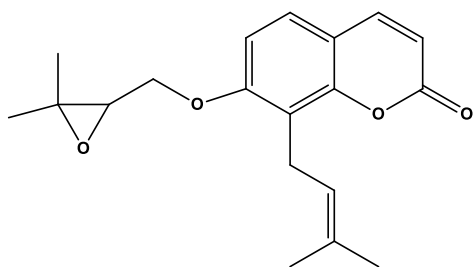
imperatorin (A)



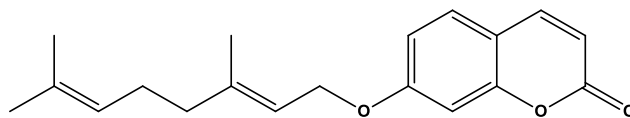
fellopterin (B)



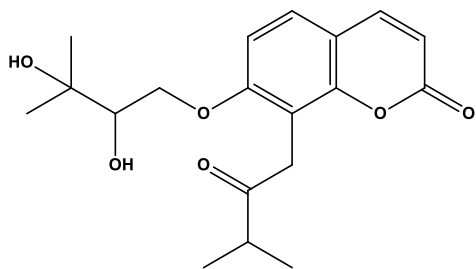
szkoparon (C)



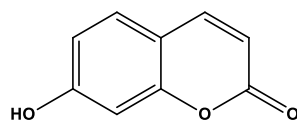
mirzellanin (D)



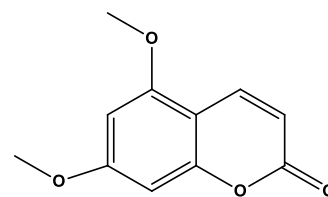
auraptén (E)



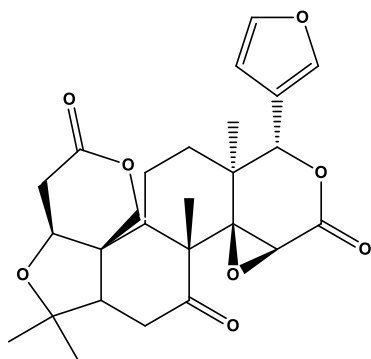
trifaziol (F)



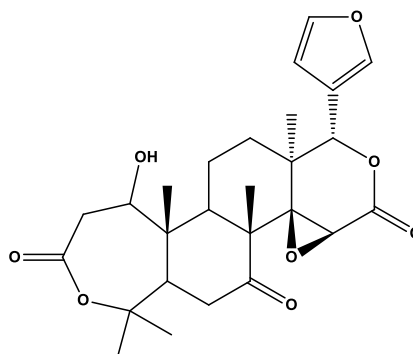
umbelliferon (G)



citroptén (H)



limonin (I)



dezacetil-nomilin (J)

Az izolált vegyületek farmakológiai aktivitása

Antiproliferatív és citotoxikus aktivitás

Az izolált vegyületek egyike sem mutatott aktivitást a citotoxicitási és az antiproliferatív vizsgálatok során normál (MRC-5) vagy doxorubicin-érzékeny vastagbélkarcinóma (COLO 205) sejtvonalakon. Néhány anyag azonban hatásosnak bizonyult a rezisztens COLO 320 sejtvonalakon. Az auraptén jelentős antiproliferatív hatást mutatott a COLO 320 sejteken (IC_{50} érték $25,28 \pm 0,42 \mu\text{M}$), míg az imperatorin, a fellopterin, és a mirzellin mérsékelt aktivitást mutatott, az IC_{50} értékeik rendre $40,47 \pm 1,22$, $43,71 \pm 1,78$, és $47,94 \pm 1,11 \mu\text{M}$ (1. táblázat).

1. táblázat Antiproliferatív hatás

Vegyület	Átlag (μM)	SD
Colo 320 AP DOXO (kontroll)	0,2	0,002
imperatorin	40,47	1,22
fellopterin	43,71	1,78
szkoparon	50,24	2,33
mirzellin	47,94	1,11
auraptén	25,28	0,42
trifaziol	72,05	1,38

Checkerboard kombinációs vizsgálat

A kombinációs vizsgálatok során a vizsgált vegyületek doxorubicinnel való interakcióinak különböző dózisait vizsgáltuk. Bizonyos dózisokban egyes anyagok, köztük a szkoparon, a mirzellin és a dezacetil-nomilin szinergikus hatást mutatnak a doxorubicinnel. Ez az eredmény arra utalhat, hogy bizonyos daganattípusok kezelése során kombinációban alkalmazva őket növelhetik a hatékonyságukat. A fellopterin, a szkoparon és az auraptén antagonist hatást mutatott bizonyos koncentrációkban (2. táblázat). Az előzőekkel ellentétben, az ilyen kölcsönhatások csökkenthetik a kemoterápia hatékonyságát.

2. táblázat Kombinációs vizsgálat eredménye

Vegyület	Kezdő konc.	Arány	Kombinációs index (CI)	SD	Interakció típusa
imperatorin	150 µM	17.42:1	1,29	0,11	mérsékelt antagonistá
		34.84:1	1,06	0,07	additív hatás
		69.68:1	0,75	0,06	mérsékelt szinergista
		139.36:1	1,24	0,05	mérsékelt antagonistá
		278.72:1	0,99	0,04	additív hatás
		557.44:1	0,99	0,11	additív hatás
fellopterin	150 µM	17.42:1	2,31	0,46	antagonista
		34.84:1	1,4	0,17	mérsékelt antagonistá
		69.68:1	1,33	0,15	mérsékelt antagonistá
		139.36:1	1,54	0,26	antagonista
		278.72:1	1,05	0,12	additív hatás
		557.44:1	1,03	0,23	additív hatás
szkoparon	200 µM	23.2:1	2,06	0,39	antagonista
		46.4:1	1,22	0,18	mérsékelt antagonistá
		92.8:1	0,81	0,05	mérsékelt szinergista
		185.6:1	0,75	0,03	mérsékelt szinergista
		371.2:1	0,62	0,05	szinergista
		742.5:1	0,6	0,07	szinergista
mirzellan	150 µM	17.42:1	1,17	0,09	csekély antagonistá
		34.84:1	0,72	0,05	mérsékelt szinergista
		69.68:1	0,83	0,04	mérsékelt szinergista
		139.36:1	0,58	0,11	szinergista
		278.72:1	0,64	0,12	szinergista
		557.44:1	0,73	0,21	mérsékelt szinergista
auraptén	80 µM	9.2:1	3,16	0,85	csekély szinergista
		18.4:1	8,37	1,03	erős antagonistá
		36.8:1	1,13	0,2	csekély antagonistá
		73.6:1	1,72	0,24	antagonista
		147.2:1	2,06	1	antagonista
		294.4:1	5,3	1,6	erős antagonistá
trifaziol	200 µM	23.2:1	0,86	0,06	csekély szinergista
		46.4:1	0,76	0,08	mérsékelt szinergista
		92.8:1	0,82	0,03	mérsékelt szinergista
		185.6:1	0,78	0,02	mérsékelt szinergista
		371.2:1	0,81	0,1	mérsékelt szinergista
		742.5:1	0,82	0,32	mérsékelt szinergista
dezacetil-nomilin	200 µM	23.2:1	1,18	0,19	csekély additív hatás
		46.4:1	1,02	0,08	csekély additív hatás
		92.8:1	0,67	0,04	szinergista
		185.6:1	0,66	0,07	szinergista
		371.2:1	0,62	0,02	szinergista
		742.5:1	0,82	0,32	mérsékelt szinergista

A vegyületek hatásai effluxpumpákon

A konvencionális ismeretek szerint, ha a rodamin akkumulációs vizsgálatban a FAR (fluorescence activity ratio) érték nagyobb, mint 2, akkor az anyag erős P-glikoprotein gátlónak tekinthető. Pozitív kontrollként a tariquidart használtuk (FAR-érték: 11,44 0,2 μ M-nál). A vizsgált vegyületek közül négy már 20 μ M-os koncentrációban hatásos volt. A fellopterin, a szkoparon, a mirzellin és az auraptén FAR értéke 2,63, 2,02, 4,86 és 4,00 volt rendre (3. táblázat).

Az etidium-bromid (EB) akkumulációs vizsgálat megmutatja az általános effluxpumpa (EP) EB szubsztrátjának intracelluláris felhalmozódását azáltal, hogy a baktériumsejtben felhalmozódó potenciális effluxpumpa-inhibítor megemeli az EB fluoreszcenciájának szintjét. A valós idejű akkumulációs görbék relatív fluoreszcencia indexét (RFI) használtuk a vegyületek EP-gátló aktivitásának összehasonlítására. A fellopterin és a mirzellin figyelemre méltó aktivitást mutatott 5,49 és 5,51 RFI értékekkel. Ezek az értékek magasabbak voltak, mint a pozitív kontrollé, a reszperiné (2,77). Ezenkívül a szkoparon mutatott még mérsékelt aktivitást, amint azt az 1,04-os RFI-értéke mutatja. Az eredmények alapján ezek az anyagok hatékony EP-gátlóknak tekinthetők.

3. táblázat Efflux pumpa gátló hatásai az izolált vegyületeknek

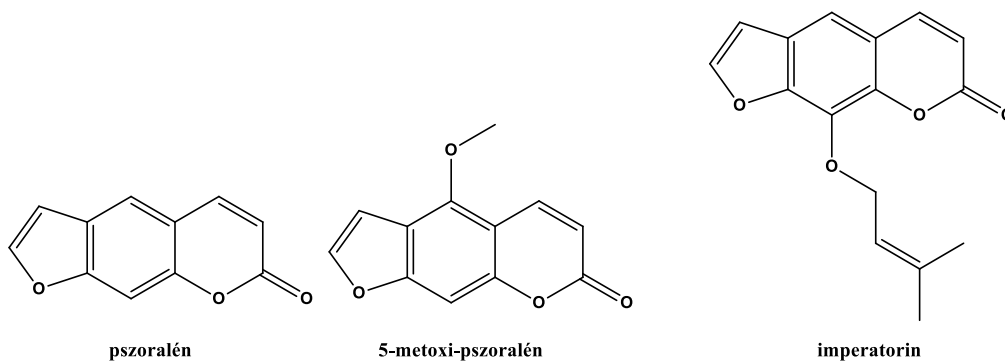
Vegyület neve	Koncentráció (μ M)	FL-1	FAR
tariquidar	0,2	88,20	11,44
imperatorin	2	11,30	1,47
	20	9,82	1,27
fellopterin	2	11,10	1,44
	20	20,30	2,63
szkoparon	2	8,01	1,04
	20	15,60	2,02
mirzellin	2	10,90	1,41
	20	37,50	4,86
auraptén	2	13,60	1,76
	20	30,80	4,00
trifaziol	2	14,20	1,84
	20	14,30	1,85
limonin	2	2,92	0,38
	20	10,00	1,30
dezacetil-nomilin	2	4,61	1,01
	20	3,53	0,78

*FL-1: a sejtek fluoreszcencia intenzitásának átlaga

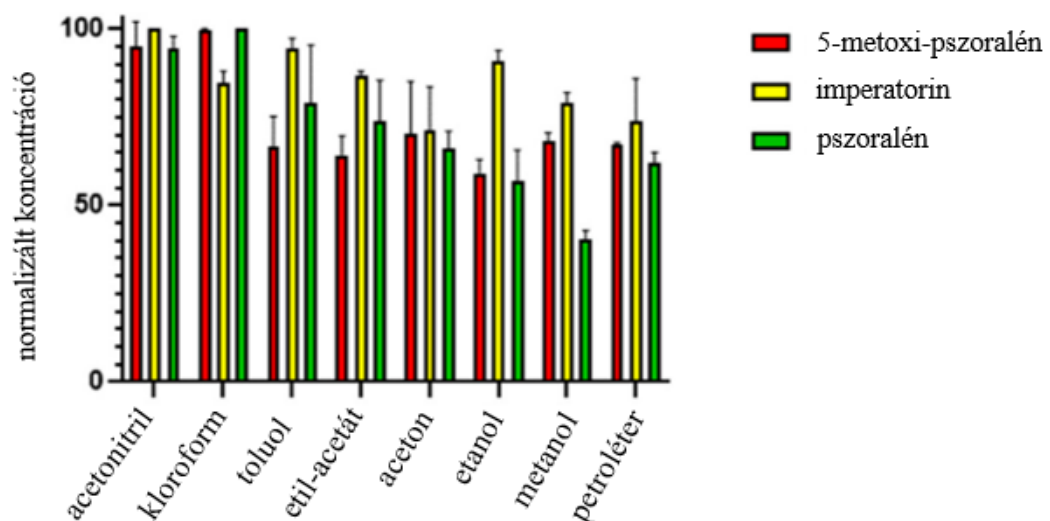
Egy későbbi kísérletben három vegyület (imperatorin, mirzellin és az auraptén) mérsékelt aktivitást mutatott az *E. coli* AG100-ra, 0,26, 0,39 és 0,34 RFI értékekkel. A pozitív kontroll a CCCP volt, 1,34-es RFI-értékkel.

Kivonási hatékonyság vizsgálatának eredménye az édeskömény minták esetén

Kísérletünk középpontjában három furokumarin — pszoralén, 5-metoxi-pszoralén, és imperatorin — állt, amelyeknek a jelenlétéről beszámoltak az édeskömény különböző részeiben.



A kivonás optimalizálásának eredményeképpen megállapítottuk, hogy az acetonitril a leghatékonyabb kivonószer a furokumarinok maximális kinyeréséhez. Emiatt a kísérleteink során a továbbiakban ezt használtuk (1. ábra).



1. ábra Az extrakció hatékonysága különböző oldószerekkel végzett kivonások esetén

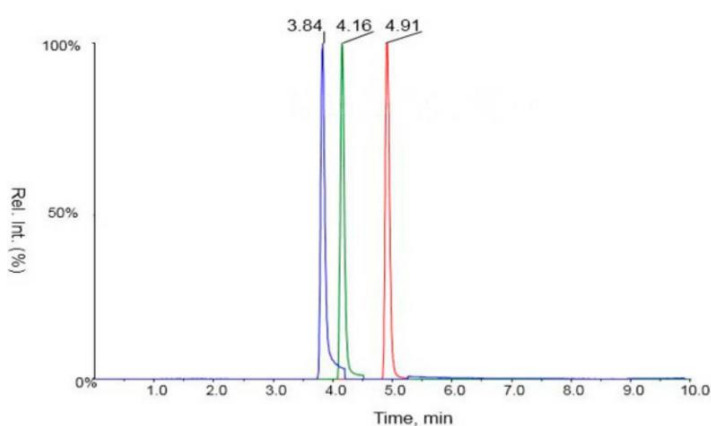
Az extrakció hatékonyságának vizsgálata során nem találtunk jelentős különbséget abban a tekintetben, hogy a mintákon a kivonás előtt vagy utána végeztük a spike-olást, ez pedig azt jelzi, hogy az analitok stabilak voltak az extrakció során. Továbbá a viszonylag magas kinyerési százalékok (80,17-133,44%) alátámasztották, hogy a mintaelőkészítési módszer megfelelő volt. (4. táblázat).

4. táblázat A három vizsgált furokumarin visszanyerési értékei kivonás előtt vagy után végzett spike-olás esetén

	Visszanyerés (%)		
	pszoralén	5-metoxi-pszoralén	imperatorin
Spike kivonás előtt	101,34	105,81	64,56
Spike kivonás után	133,44	80,17	92,42

Édeskömény minták furokumarintartalma

Az alkalmazott analitikai módszerrel mind a három vizsgált furokumarint – pszoralén, 5-metoxi-pszoralént és az imperatorint – nagy hatékonysággal és szelektivitással tudtuk detektálni (2. ábra). A mennyiségi meghatározás és kimutatási határ rendre 8,8-10,1 nM és 28,7-31,3 nM közötti volt. A vizsgált vegyületek lineáris kalibrációs egyeneseit 10-1000 nM közötti koncentráció tartományban határoztuk meg. A vegyületekhez tartozó egyenletek: pszoralén: $y = 12.2x + 185$ ($R^2 = 0.9960$); 5-metoxi-pszoralén: $y = 38x + 159$ ($R^2 = 0.9991$); imperatorin: $y = 96.3x - 1.25 \times 10^{-3}$ ($R^2 = 0.9997$). A referenciavegyületek esetében (RSD%, $n = 12$) a napon belüli precízió értéke 0,67% és 1,81% között mozgott. A módszerünk pozitív reprodukálhatóságát bizonyították ezek az eredmények.



2. ábra A pszoralén ($R_t = 3,84$ min), az 5-metoxi-pszoralén ($R_t = 4.16$ min) és az imperatorin ($R_t = 4.91$ min) keverékének LC-MS kromatogramja

Az imperatorin mennyisége minden vizsgált mintában a kimutatási határ alatt volt. Az 5-metoxi-pszoralén hét, míg a pszoralén 19 mintában nem volt kimutatható (5. táblázat). A pszoralén koncentrációja körülbelül egy nagyságrenddel alacsonyabb volt, mint az 5-metoxi-pszoraléné. Az Európai Gyógyszerügynökség monográfiáival összhangban kiszámítottuk a pszoralén és az 5-metoxi-pszoralén mennyiségét az édeskömény napi maximális terápiás dózisához viszonyítva (7,5 g). A 33 mintából hétben a furokumarinok össz mennyisége a kimutatási határ alatt volt. Az édeskömény mintáknak a furokumarintartalmát az összes furokumarin mennyiség alapján értékeltük, amely pedig 0,0099 és 1,2209 $\mu\text{g}/7,5 \text{ g}$ között mozgott (5. táblázat).

5. táblázat Édeskömény minták furokumarintartalma

Minta	$\mu\text{g}/7,5 \text{ g}$ növény ($\pm\text{SD}$)		
	pszoralén	5-metoxipszoralén	Total
1	0,0551 \pm 0,0015	0,6829 \pm 0,0311	0,7380
2	0,0431 \pm 0,0017	0,4830 \pm 0,0172	0,5261
3	0,0504 \pm 0,0011	0,6192 \pm 0,0256	0,6696
4	0,0561 \pm 0,0019	0,6419 \pm 0,0301	0,6980
5	0,0646 \pm 0,0031	0,6684 \pm 0,0219	0,7330
6	0,0449 \pm 0,0011	0,5239 \pm 0,0092	0,5688
7	0,1072 \pm 0,0050	1,1137 \pm 0,0112	1,2209
8	0,0886 \pm 0,0039	1,1052 \pm 0,0216	1,1938
9	0,0938 \pm 0,0045	1,0114 \pm 0,0328	1,1052
10	0,071 \pm 0,0018	0,8730 \pm 0,0178	0,9440
11	0,0175 \pm 0,0006	0,1165 \pm 0,0033	0,1340
12	*	0,0220 \pm 0,0007	0,0220
13	*	0,0236 \pm 0,0009	0,0236
14	*	*	*
15	*	0,0183 \pm 0,0008	0,0183
16	0,0142 \pm 0,0002	0,0618 \pm 0,0021	0,0760
17	*	*	*
18	*	*	*
19	*	*	*
20	0,0193 \pm 0,0007	0,2360 \pm 0,0072	0,2553
21	*	*	*
22	*	0,0116 \pm 0,0003	0,0116
23	*	*	*
24	*	*	*
25	0,0133 \pm 0,0005	0,1184 \pm 0,0039	0,1317
26	0,0078 \pm 0,0002	0,0321 \pm 0,0007	0,0399
27	*	0,0188 \pm 0,0006	0,0188
28	*	0,0426 \pm 0,0018	0,0426

29	*	0,0111 ± 0,0003	0,0111
30	*	0,1045 ± 0,0061	0,1045
Német fajta 'Berfena'	*	0,0634 ± 0,0028	0,0634
Német fajta 'Grossfrüchtig'	*	0,0099 ± 0,0002	0,0099
Magyar fajta 'Soroksár'	*	0,0745 ± 0,0011	0,0745
Fűszerkömény - kereskedelmi tétel	*	0,1062 ± 0,0018	0,1062

* kimutatási határérték alatt

A növényi kivonatok alacsony furokumarintartalma alapján elmondható, hogy az édeskömény termésének terápiás alkalmazása (legfeljebb 7,5 g/nap) biztonságosnak tekinthető felnőttek esetében – legalábbis a furokumarintartalom szempontjából.

ÖSSZEGZÉS

Az értekezésben bemutatott munka egyik célja az volt, hogy a *Citrus trifoliata* magjából és héjából kumarinokat, furokumarinokat és limonoidokat izoláljunk, valamint ezeknek a vegyületeknek a bioaktivitását vizsgáljuk. A másik cél pedig az volt, hogy megmérjük különböző *Foeniculum vulgare* minták furokumarintartalmát. Az izoláláshoz különböző kromatográfiai technikákat alkalmaztunk (például közepes nyomású folyadékkromatográfiát, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiát, flash kromatográfiát, vékonyréteg-kromatográfiát, légköri nyomású oszlopkromatográfiát). Az édeskömény minták furokumarintartalmának meghatározását HPLC-MS módszerrel végeztük.

A *Citrus trifoliata* magjából és héjából 10 vegyületet izoláltunk. Ezek közül a vegyületek közül kettő furokumarin (imperatorin, fellopterin), hat kumarin (szkoparon, mirzellin, auraptén, trifaziol, umbelliferon, citroptén), és kettő limonoidszármazék (limonin, dezacetil-nomilin). Bár az általunk vizsgált vegyületeket korábban már azonosították a fajból, hasonló bioaktivitási vizsgálatokat még nem végeztek ezekkel a vegyületekkel. Az izolált vegyületek egyike sem mutatott erős antiproliferatív hatást, és nem bizonyultak citotoxikus hatásúnak normál és a doxorubicin-szenzitív vastagbélkarcinóma sejtvonalakon. Két furokumarin, az imperatorin és a fellopterin mérsékelt antiproliferatív hatást fejtett ki a COLO 320 tumorsejtvonalra, valamint a fellopterin erős P-glikoprotein-gátló aktivitást is mutatott. Etidium-bromid akkumulációs vizsgálattal kimutattuk a vizsgált furokumarinok effluxpumpa-gátló hatását különböző baktériumtörzseken. A fellopterin antagonistá hatást fejtett ki doxorubicinnel kombinálva különböző koncentrációkban, ezzel ellentétben az imperatorin szerény szinergikus hatást is mutatott. Az auraptén, a trifaziol és a szkoparon voltak az egyedüli kumarinok, amelyek antiproliferatív aktivitást mutattak a COLO 320 sejtvonalon. Ezenkívül a FACS vizsgálat kimutatta, hogy az auraptén hatékony P-glikoprotein-inhibitor. A checkerboard vizsgálat eredményei különböző kölcsönhatásokat mutattak ki az egyidejűleg alkalmazott doxorubicinnel, a szinergizmustól az antagonizmusig.

Összességében a bemutatott eredmények rávilágítanak arra, hogy ezek a vegyületek kölcsönhatásba léphetnek kemoterápiás szerekkel, bár a kölcsönhatások gyakorlati jelentőségének megértéséhez további vizsgálatok szükségesek. Ugyanakkor az általunk vizsgált vegyületek jelentős mennyiségben kerülnek a szervezetbe citrusfélék fogyasztása vagy terápiás célú felhasználása során, ami alátámasztja eredményeink tudományos jelentőségét.

A furokumarinok jól ismertek fototoxikus hatásaikról. A szakirodalomban korábban már beszámoltak arról, hogy ezek a vegyületek jelen vannak az édesköményben, de mennyiségükről megbízható információ nem állt rendelkezésre. Az édesköményt jelenleg is széles körben használják gyógy- és aromanövényként, a furokumarintartalomtól adódó kockázat mértéke ugyanakkor nem ismert. Ennek jobb megismerésére nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás és tömegspektrometriás (LC-MS) technikával 33 édesköményminta pszoralén-, 5-metoxi-pszoralén- és imperatorintartalmát vizsgáltuk.

Az étrendből származó furokumarinok becsült átlagos bevitele a nyugati populációkban körülbelül 1,2-1,5 mg/nap, amelynek a fő forrásai a citrusfélék, például a grapefruit. Az Európai Gyógyszerügynökség állásfoglalása szerint a gyógynövénykészítményekkel bevitt napi 15 µg furokumarin (azaz jóval kisebb mennyiség) nem jelent kockázatot. Kísérleteinkben az édeskömény termések furokumarintartalma – az Európai Gyógyszerügynökség által közzétett monográfiában megadott legmagasabb terápiás dózisban alkalmazva – 1,22 µg/nap volt. Emiatt az édeskömény terápiás alkalmazása biztonságosnak tűnik, legalábbis a furokumarintartalmát tekintve. Továbbá, mivel az itt megadott értékeket a maximális extrakció érdekében szerves oldószerrel készített kivonatokból mértük, várható, hogy a kevésbé hatékony extrakciós oldószerrel (vízzel) készített gyógynövényteák furokumarin koncentrációja jelentősen alacsonyabb.

Az itt bemutatott munka preparatív fitokémiai és analitikai kísérletek kombinációján alapul. Bár az értekezés egy módszertanilag sokszínű kutatási projektet foglal össze, az alapvető célok hasonlóak voltak: hozzájárulni a gyógynövények biztonságos és ésszerű felhasználásához, valamint olyan növényi metabolitok azonosításához, amelyek felhasználhatók a terápiában vagy a gyógyszerkutatásban.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni legnagyobb köszönetemet témavezetőmnek, Csupor Dezsőnek, aki inspirációt adott ahhoz, hogy elkezdjem és befejezzem doktori munkámat, és aki munkám során végig támogatott és fáradhatatlanul segített. Mindig hálás leszek neki.

Nagy köszönettel tartozom Hohmann Judit professzor asszonynak, aki lehetővé tette számomra, hogy kutatómunkámat a Farmakognóziai Intézetben végezhettem.

Különösen hálás vagyok Horváth Attilának, aki végig segítette a laboratóriumi munkámat, és akinek a támogatása és segítsége nélkül ez a projekt nem valósulhatott volna meg.

Mindig hálás leszek a laboratóriumi kollégáimnak Kiss Tivadarnak, Zomborszki Zoltán Péternek, Javad Mottaghishnehnek (Imannak), Vollar Martinnak, Kovács Balázsnak, Horváth-Boros Klárának és Bajtel Ákosnak, akik – a támogatásuk mellett – igazán élvezetessé és emlékezetessé tették ezt a négy évet.

Hasonlóképpen köszönettel tartozom a Farmakognóziai Intézetben dolgozó valamennyi kollégámnak, különösképp Vasas Andreának és Veres Katalinnak, akik az Intézetben eltöltött évek alatt mindig támogattak.

Hálás vagyok Borcsa Lajos Botondnak (Demetria Kert, Tompa) a *Citrus trifoliata* minták gyűjtéséért és biztosításáért, valamint a faj vizsgálatának javaslatáért; Gosztola Beátának és Németh-Zámbori Évának (Szent István Egyetem Gyógy- és Aromanövények Tanszék) az édeskömény minták biztosításáért; Csorba Attilának az LC-MS mérésekben nyújtott segítségéért; Kúsz Norbertnek az NMR mérésekért és kiértékelésekért, valamint Spengler Gabriellának és Szemerédi Nikolettának (Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai Intézet) az antiproliferatív és citotoxicitási vizsgálatokért.

Végül külön köszönettel tartozom a szüleimnek, vőlegényemnek és a barátaimnak, akiknek a támogatása és szeretete nélkül nem jöhetett volna létre ez a munka.

AZ ÉRTEKETÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Kerekes D**, Horváth A, Kúsz N, Borcsa B. L; Szemerédi N, Spengler G, Csupor D.
Coumarins, furocoumarins and limonoids of *Citrus trifoliata* and their effects on human colon adenocarcinoma cell lines
Heliyon **2022**, 8(9): e10453
Scopus – Multidisciplinary; SJR: Q1 IF: 4

- II. **Kerekes D**, Csorba A, Gosztola B, Németh-Zámbori É, Kiss T, Csupor D.
Furocoumarin content of Fennel – below the safety threshold
Molecules **2019**, 24(15): 2844
Scopus – Pharmaceutical Science; SJR: Q1 IF: 3,267

Az összesített impakt faktor: 7,267