

Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszerésztudományi Kar  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola  
Farmakognóziai Intézet

**Asteraceae fajok antiproliferatív hatású  
másodlagos anyagcseretermékeinek  
hatáskövető vizsgálata**

Doktori értekezés tézisei  
**Dr. Csupor-Löffler Boglárka**

Témavezetők:  
**Prof. Hohmann Judit**  
**Dr. Hajdú Zsuzsanna**

Szeged  
2012.

## 1. BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedekben számos új daganatellenes szert (pl. taxol, kamptotecin, podofillotoxin-származékok és *Vinca* alkaloidok) fedeztek fel vagy fejlesztettek ki magasabbrendű növények népi gyógyászati felhasználása vagy azok tumorellenes hatására irányuló szűrővizsgálatok alapján. A forgalomban lévő daganatellenes gyógyszermolekulák több mint 60%-a nem szintetikus eredetű. Ezen az indikációs területen az átlagnál jóval magasabb a természetes eredetű hatóanyagok aránya, és az ilyen vegyületek kutatása napjainkban is igen intenzív. A sikerrel záruló kutatások legújabb példája az *Euphorbia peplus*-ból izolált citotoxikus hatású ingenol-3-angelát, amelyet az USA gyógyszerengedélyező hatósága 2012 elején törzkönyvezett a keratosis solaris kezelésére alkalmas gyógyszerként *Picato*<sup>®</sup> néven. A *Dysoxylum binectariferum*-ból kinyert rohikutin származékának tekinthető, szintetikus előállított flavopiridol szintén közel van a gyógyszerre váláshoz: jelenleg 9 klinikai vizsgálat folyik a vegyülettel (I. és II. fázisú), amelyek leukémia, limfóma és szolid tumorok kezelését célozzák. További példaként említhető a *Thapsia garganica* szeszkviterpénje, a tapszigargin, amely szolid tumorok terápiájában mutatkozott ígéretesnek egy klinikai vizsgálatban.

A növényvilág potenciális daganatgátló anyagai felderítésének jellemző lépései a tumorellenes hatás tesztelése *in vitro* szűrővizsgálatban, a növényi kivonat hatáskövetett, többlépéses kromatográfiás frakcionálása, amely elvezethet a hatáshordozó anyagok azonosításához. A biológiai hatás követésére számos daganatos sejtvonalat alkalmaznak modellként; a preparatív műveletek után a vegyületek fizikai-kémiai jellemzése és további farmakológiai vizsgálatok következnek.

Szűrővizsgálatok elvégzésére jellemzően etnobotanikai adatok alapján vagy ismert daganatellenes hatású növényekkel való kemotaxonomiai rokonság alapján választanak ki növényfajokat. HARTWELL and GRAHAM munkájában, amelyben a daganatos betegségek kezelésére hagyományos használt gyógynövényeket gyűjtötték össze, mintegy 300, Asteraceae családba tartozó faj szerepel. Az Asteraceae fajok tumorellenes hatásának vizsgálatával számos kutatás foglalkozott, és a hatásért felelős vegyületekként általában szeszkviterpén-laktonokat vagy flavonoidokat azonosítottak. A vegyületek közül több (pl. artemizinin- és partenolid-származékok, szilibinin) kemoterápiás szerként humán kipróbálás alatt áll, számos anyagot (pl. apigenin, eupatoriopikrin, helenanolid- és xantanolid-származékok) pedig ígéretes vegyületként tartanak számon, mint a klinikai vizsgálatok ígéretes jelöltjei.

Jóllehet az Asteraceae család egyes fajainak daganatellenes hatását kísérletes és etnobotanikai adatok is alátámasztják, azokkal mindössze néhány szűrővizsgálatot végeztek, és európai fajokkal egyáltalán nem történt ilyen vizsgálat. Doktori munkám részeként Magyarországon fellelhető Asteraceae fajok átfogó daganatellenes szűrővizsgálatát végeztem el, valamint a *Conyza canadensis* (L.) CRONQ. és az *Achillea millefolium* s.l. részletes fitokémiai vizsgálatával foglalkoztam.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Az elmúlt években a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Karának Farmakognóziái Intézete és Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézete közös kutatómunkába kezdett a magyar flóra növényeiben található daganatellenes hatású vegyületek azonosítása és vizsgálata céljából. Ennek részeként feladatom volt az Asteraceae család Magyarországon honos fajainak daganatellenes hatásra történő szűrővizsgálata és ennek eredményei alapján az ígéretes fajok hatóanyagainak azonosítása. A munka részeként célul tűztem ki

- az Asteraceae fajok fitokémiájával és daganatellenes hatásával kapcsolatos szakirodalom áttekintését,
- a növényi nyersanyag begyűjtését a szűrővizsgálathoz,
- a gyűjtött növények különböző polaritású oldószerekkel készített kivonatainak elkészítését a szűrővizsgálathoz,
- a kivonatok daganatsejtek proliferációját befolyásoló hatásának vizsgálatát (SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet),
- makáns antiproliferatív hatással rendelkező növényfajok kiválasztását további fitokémiai vizsgálatokra,
- a növényi nyersanyag begyűjtését a preparatív növénykémiai munkához,
- a növényi nyersanyagok kivonását és hatáskövető frakcionálás révén az aktivitásért felelős vegyületek izolálását kromatográfiai módszerek alkalmazásával,
- a kinyert vegyületek szerkezetének meghatározását NMR- és tömegspektroszkópiás módszerekkel, az új vegyületek esetén a szerkezetmeghatározás szempontjából lényeges spektrális adatok meghatározását, ismert anyagok esetén az adatok kiegészítését,
- az izolált tiszta vegyületek farmakológiai jellemzését (SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet).

## 3. ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

A daganatellenes hatásra történő szűrővizsgálathoz Magyarország több részén gyűjtöttünk növényi mintákat 2004 júniusa és augusztusa között. A preparatív növénykémiai vizsgálathoz a *Conyza canadensis* (L.) gyökerét a Dél-Alföldön gyűjtöttük 2004 szeptemberében. A növényeket RÉDEI TAMÁS (MTA ÖBKI, Vácrátót) azonosította. Az *A. millefolium* s.l. hajtásdrogját 2005-ben a Rózsahegyi Kft-től (Erdőkertes) szereztük be. A szárított növényi részeket metanollal perkoláltuk, a betöményített kivonatokat vízzel elegyítettük, majd n-hexánnal és kloroformmal extraháltuk. A szűrővizsgálathoz a növényekből vizes kivonatokat is készítettünk.

A kivonatok tisztítását többlépcsős kromatográfiai frakcionálással végeztük el, vákuum-folyadékkromatográfiát (VLC), rotációs planárokromatográfiát (RPC), preparatív rétegekromatográfiát (PLC), gélszűrést (GF) és nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC) alkalmazva. Állófázisként

normál és fordított fázisú SiO<sub>2</sub>-t, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-t vagy Sephadex LH-20-at használtunk. A vegyületek szerkezetét spektroszkópiás módszerekkel (NMR, ESIMS and HREIMS) határoztuk meg.

A szűrővizsgálatok és az *A. millefolium* vegyületeinek farmakológiai vizsgálata során 3 humán sejtvonalon [HeLa (cervix adenokarcinóma), MCF-7 (emlő adenokarcinóma) és A-431 (epiteliális eredetű bőrkarcinóma)] vizsgáltuk az antiproliferatív hatást MTT teszt alkalmazásával. A *C. canadensis* vegyületeit a fent említetteken kívül MRC-5 (nem daganatos humán fibroblaszt) sejtvonalon is vizsgáltuk. Pozitív kontrollként doxorubicint és ciszplatint alkalmaztunk.

#### 4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

##### 4.1. MAGYARORSZÁGI ASTERACEAE FAJOK DAGANATELLENES HATÁSÁNAK SZŪRŐVIZSGÁLATA

Az Asteraceae család 50 fajának antiproliferatív hatásra történő szűrővizsgálata során a Cynareae (13 faj), a Cichorieae (12), az Astereae (6), az Anthemideae (11), az Inuleae (3) és a Heliantheae (5) nemzetség-csoportba tartozó növények kivonatainak *in vitro* antiproliferatív aktivitását mértük HeLa, A-431 és MCF-7 sejtvonalakon (10 µg/ml). Összesen 420, különböző növényi részekből *n*-hexánnal (A), kloroformmal (B), metanol-víz elegyével (C) és vízzel készített kivonat (D) vizsgálatára került sor.

21 faj 42 kivonata fejtett ki legalább 50%-os proliferációgátlást legalább 1 sejtvonalon. 22 faj kivonata esetén mérsékelt (25–49.99%) sejtnövekedést gátló hatást tapasztaltunk, míg 7 faj hatástalannak bizonyult. A legalább 50%-os mértékű gátló hatású növények kivonataival további vizsgálatokat végeztünk az IC<sub>50</sub> értékek meghatározására. A legtöbb aktívnek bizonyuló kivonat föld feletti részekből készült, és elsősorban a B extraktumok voltak hatásosak. A szűrővizsgálatban a legjelentősebb aktivitást a *C. jacea* gyökerének kloroformos kivonata esetén tapasztaltuk (IC<sub>50</sub> 0,37 µg/ml HeLa sejteken).

##### **A hagyományos alkalmazás és a biológiai hatás közötti kapcsolat**

A *Conyza canadensis*, *Erigeron annuus*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Helianthus annuus*, *Xanthium italicum*, *Arctium lappa*, *Cichorium intybus* és az *Onopordum acanthium* esetén a megfigyelt antiproliferatív hatás összhangban van a növények hagyományos, daganatellenes alkalmazásával. Más fajok, így az *Artemisia campestris*, *A. dracunculus*, *A. vulgaris*, *Tripleurospermum inodorum*, *Carduus acanthoides*, *Lactuca serriola*, *Sonchus oleraceus*, *Taraxacum officinale*, *Anthemis tinctoria*, *Matricaria chamomilla* és a *Tragopogon pratensis* nagyon mérsékelt hatásúnak vagy hatástalannak bizonyult annak ellenére, hogy a népi orvoslásban ezeket a fajokat rákos megbetegedések kezelésére használták.

##### **Hatáskövető vizsgálatra érdemes fajok**

Több faj esetén, így az *Anthemis ruthenica*, *Inula ensifolia*, *Centaurea biebersteinii*, *C. spinulosa* és a *Cirsium vulgare* esetén nem voltak szakirodalmi előzmények a növények farmakológiai és fitokémiai vizsgálatával kapcsolatban. Jelentős tumorsejt-növekedést gátló hatásukat tekintve az említett fajok további vizsgálata ígéretes lehet új citosztatikus növényi anyagok azonosítása szempontjából.

Bizonyos, általunk hatásosnak talált növényfajokat kémiai és farmakológiai szempontból már korábban is vizsgáltak, de hatóanyagaikat nem azonosították (*Achillea collina*, *Conyza canadensis*, *Erigeron annuus*, *Centaurea jacea*, *Xanthium italicum* és *Lactuca viminea*), vagy feltehetőleg nem tárták fel teljes mértékben (*Artemisia asiatica*, *A. japonica*, *Onopordum acanthium* és *Ambrosia artemisiifolia*). Ezek a növények további vizsgálatokra érdemesek a daganatellenes hatást kifejtő vegyületeik felderítése céljából.

#### **4.2. A HATÁSKÖVETŐ VIZSGÁLATRA SZÁNT FAJOK KIVÁLASZTÁSA**

Szűrővizsgálatunk eredményei és a vizsgált fajokkal kapcsolatos szakirodalmi előzmények áttekintése alapján a *Conyza canadensis* (betyárkóró) és az *Achillea collinát* (mezei cickafark) választottuk ki további, részletes fitokémiai vizsgálatra, tumorellenes vegyületeik azonosítását célozva. A betyárkóróval végzett előzetes szűrővizsgálatban a gyökér *n*-hexános kivonata magas aktivitású volt (62–71%), míg a kloroformos kivonat mindegyik sejtvonal proliferációját mérsékelten (39–48%) gátolta. A növény daganatellenes hatását korábban nem vizsgálták, más kutatók elsősorban a növény föld feletti részét tanulmányozták, a gyökérből mindössze néhány vegyületet azonosítottak. Mindezt figyelembe véve ígéretesnek tűnt a növény gyökérből készült *n*-hexános és kloroformos extraktumok tanulmányozása.

Az *Achillea collina* herbájának kloroformos extraktuma különösen HeLa (88,9%) és MCF-7 (53,9%) sejteken volt aktív. A cickafark fajok közismert gyógynövények, amelyeket kémiai alapon vizsgáltak. A népi gyógyászatban a növényeket elterjedten használják rákos betegségek kezelésére, azonban a növényfajok tumorellenes hatása kísérletesen nem igazolt. A további kísérletekhez a kereskedelemben beszerezhető cickafarkfüvet (*Achillea millefolium* s.l.) használtunk.

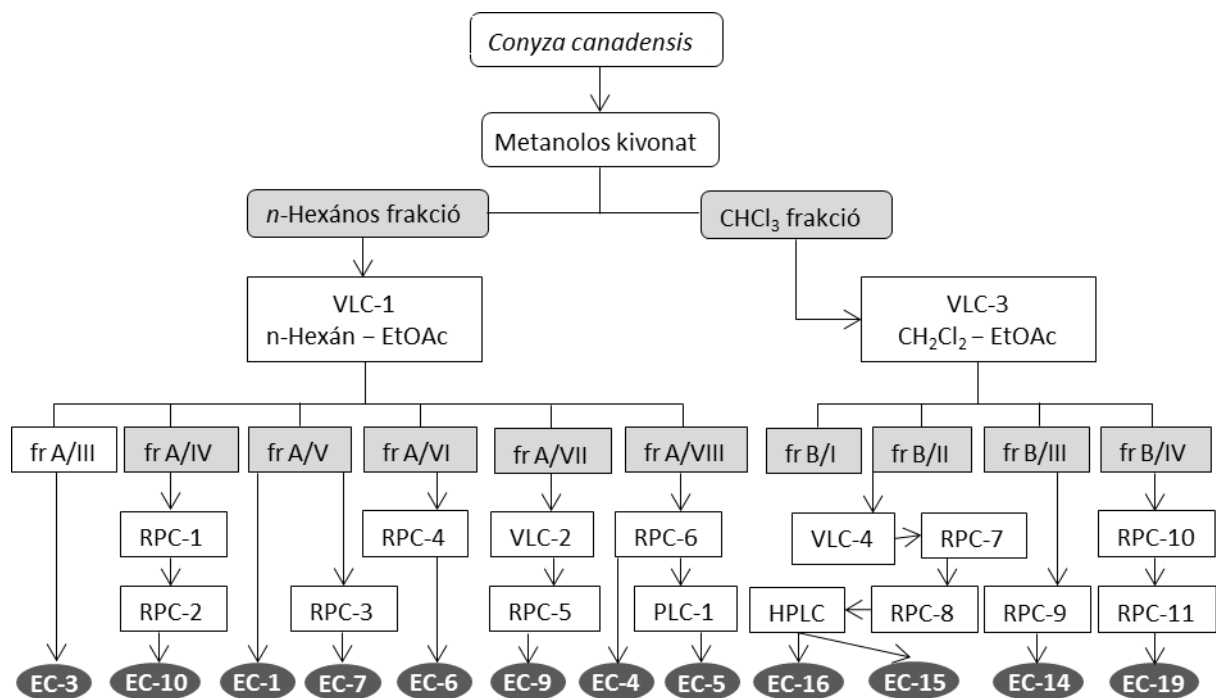
#### **4.3. HATÁSKÖVETŐ VIZSGÁLATOK**

A növényi minták feldolgozásának első lépéseként metanolos perkolálást végeztünk, majd folyadék-folyadék megosztással *n*-hexánban és kloroformban oldható frakciókat nyertünk, amelyeket különféle kromatográfiai technikák alkalmazásával frakcionáltunk a biológiai hatást MTT teszttel követve.

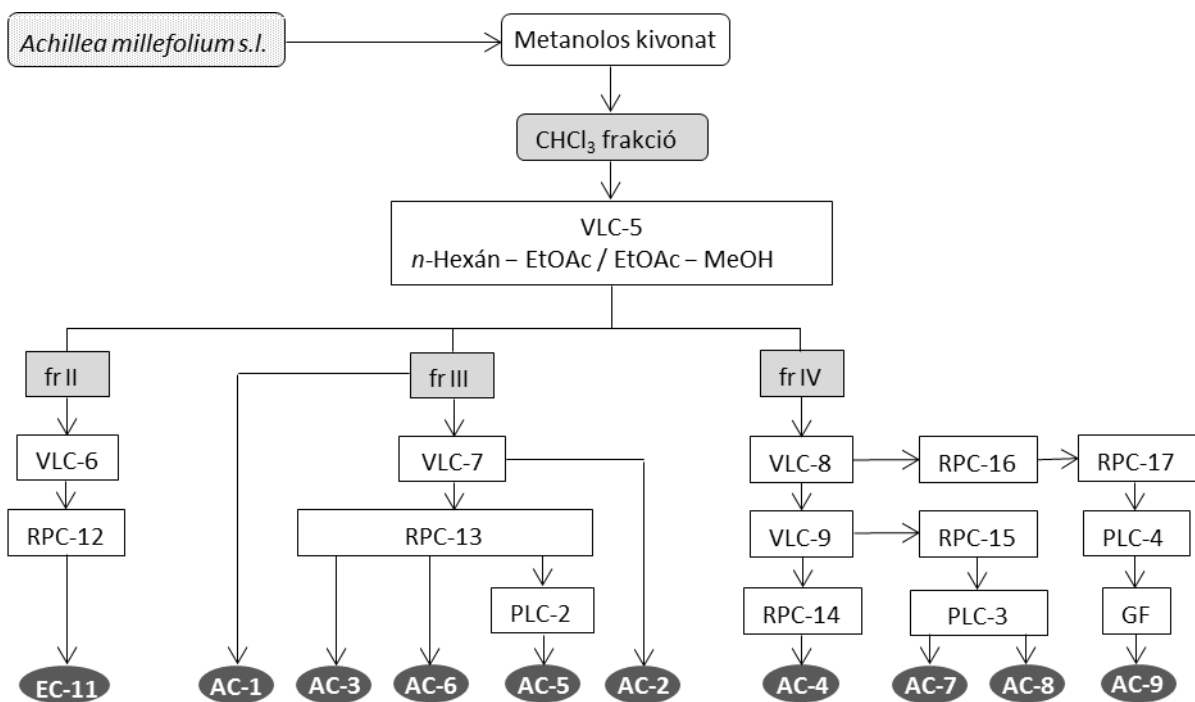
##### **A *Conyza canadensis* anyagainak izolálása**

A betyárkórógyökér *n*-hexános és kloroformos extraktumait egyaránt vizsgáltuk (**1. ábra**). A *n*-hexánban oldható kivonat durva elválasztása 12 frakciót eredményezett, amelyek közül 5 (A/IV–VIII) antiproliferatív hatású volt, ezért ezeket tovább tanulmányoztuk. A további elválasztásokra leginkább alkalmas módszernek az RPC (rotációs planárokromatográfia) bizonyult nagy szelektivitása, sebessége és kapacitása miatt. Végso tisztításra egy esetben preparatív rétegekromatográfiát alkalmaztunk. Az aktív frakciókból összesen 7 vegyületet (**EC-1, EC-4–EC-7, EC-9, EC-10**) nyertünk ki, valamint az **EC-3** egy inaktív frakcióból kristályosodott ki. A kloroformos frakció VLC elválasztásával 5 fő frakciót nyertünk, amelyek közül 4 antiproliferatív hatású volt. Mivel a magas aktivitású B/I frakció már azonosított acetiléneket (**EC-9, EC-10**) tartalmazott, a mérsékelten hatásos B/II, B/III és B/IV frakciókat dolgoztuk fel. Az előző kísérlethez hasonlóan ez esetben is az RPC volt a leggyakrabban

alkalmazott kromatográfiás tisztítási módszer. Amennyiben szelektívebb eljárásra és kíméletesebb körülményekre volt szükség, RP-HPLC-vel végeztük az elválasztást. Ily módon állítottuk elő tisztán az **EC-14–16** és az **EC-19** kísérleti jelzésű vegyületeket.



1.ábra A *C. canadensis* vegyületeinek izolálása



2.ábra Az *A. millefolium* s.l. vegyületeinek izolálása

### **Az *Achillea millefolium* s.l. anyagainak izolálása**

A cickafarkfű kloroformban oldható frakciójának durva elválasztása 8 fő frakciót eredményezett (**2. ábra**). 3, kémiailag rendkívül komplex frakció (II, III és IV) bizonyult a legaktívabbnak, ezért a cickafark esetén a további elválasztáshoz szelektívebb módszerek alkalmazására volt szükség. VLC, RPC, PLC és GF valamint eltérő polaritású és összetételű mozgófázisok többlépcsős alkalmazásával (SiO<sub>2</sub> és Sephadex LH-20 állófázisokon) sikerült elválasztani és tisztítani a növény tartalomanyagait, amelyek végső tisztítását átkristályosítással végeztük el. Ennek eredményeként 5 flavonoidot (**AC-1-3**, **AC-5**, **AC-9**) és 5 szeszkviterpén-laktont (**AC-4**, **AC-6-8**, **AC-11**) nyertünk ki tiszta formában.

#### **4.4. AZ ISZOLÁLT VEGYÜLETEK SZERKEZETVIZSGÁLATA**

A szerkezet-meghatározás szempontjából leglényegesebb adatokat NMR spektroszkópia segítségével nyertük. Minden vegyület esetén történtek 1D NMR (<sup>1</sup>H NMR és JMOD) mérések, amelyek segítségével, az irodalomban közölt adatokkal történő összevetéssel azonosítottuk a már ismert anyagokat. Az új vegyületek szerkezetének felderítéséhez 2D NMR (<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY, HSQC, HMBC és NOESY) és tömegspektrometriás vizsgálatok is szükségesek voltak.

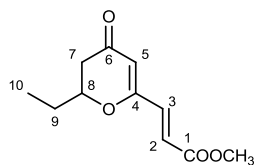
#### **A *Conyza canadensis* vegyületei**

A betyárkóró gyökeréből 12 vegyületet, köztük 2 piranonszármazékot, a konizapiranon A-t (**EC-16**) és a konizapiranon B-t (**EC-15**) azonosítottuk, amelyek új természetes anyagok. Az **EC-9** szerkezetét 4*E*,8*Z*-matrikária- $\gamma$ -laktonként, az **EC-10**-ét pedig 4*Z*,8*Z*-matrikária- $\gamma$ -laktonként határoztuk meg, amelyek a *Conyza* nemzetség jellegzetes C<sub>10</sub> acetilénjei közé tartoznak. Munkánk eredményeként kiegészítettük az utóbbi két vegyület irodalomban közölt NMR spektrumadatait és teljes <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C NMR jelhozzárendelést közöltünk. A növényben elsőként leírt 9,12,13-trihidroxi-10*E*-oktadecénsav (**EC-19**) esetén elsőként határoztuk meg a <sup>13</sup>C NMR adatokat teljes körűen. Az általunk izolált triterpének közül a taraxerán típusú taraxerolt (**EC-6**) és az adianán típusú simiarenolt (**EC-7**) korábban nem írták le a *C. canadensis*ből, míg a fridelán típusú fridelint (**EC-3**) és epifridelanolt (**EC-1**) már azonosították a növényben. A kokristályként kinyert sztigmaszterin and  $\beta$ -szitoszterin (**EC-4**), a spinaszterin (**EC-5**) és a flavon típusú apigenin (**EC-14**) ubikviter növényi tartalomanyagok.

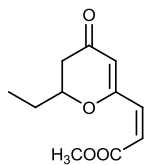
#### **Az *Achillea millefolium* s.l. vegyületei**

Az előállított vegyületek között 5 flavonoidot és 5 szeszkviterpén-laktont azonosítottunk. A korábban már ismert artemetint (**AC-3**), kaszticint (**AC-5**), centaureidint (**AC-2**), apigenint (**AC-1**), luteolint (**AC-9**) és dezacetil-matrikarint (**AC-4**) spektrális adataik alapján azonosítottuk. Az **AC-7**, **AC-8** és **AC-11** szeko-pseudogvajanolidokat elsőként írtuk le az *Achillea* nemzetségben. A paulitin (**AC-7**) és izopaulitin (**AC-8**) sztereoizomerek esetén teljes <sup>1</sup>H NMR jelhozzárendelést közöltünk és a korábban közölt <sup>13</sup>C NMR adatokat korrigáltuk. A pszilosztachin C (**AC-11**) esetén az irodalmi <sup>13</sup>C NMR adatokat kiegészítettük. A szintenint (**AC-6**) elsőként írtuk le az *A. millefolium* alakkörben. A szerkezetvizsgálat során az 1D NMR adatok alapján az **AC-6** hasonlóságot mutatott a millefinnel, amely egy C-8-as helyzetben  $\alpha$ -acetilfunkciót tartalmazó germakranolid. Ezt a vegyületet az *A. millefolium*ban KASIMOV és mtsai írták le 1972-ben. A teljes NMR jelhozzárendeléshez 2D NMR méréseket végeztünk, amelyek

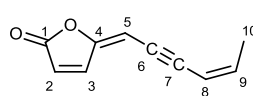
alapján egyértelművé vált, hogy az **AC-6** vegyület  $\beta$ -acetyl szubsztituenst tartalmaz, azaz a vegyület a szinteninnel, egy, az *Achillea micranthá*ból leírt germakranolid típusú vegyülettel azonos.



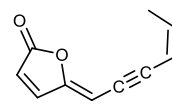
**EC-16**  
konizapiranon A



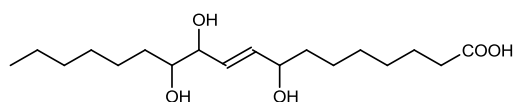
**EC-15**  
konizapiranon B



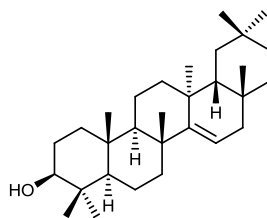
**EC-9** 4E,8Z-  
matrikária- $\gamma$ -lakton



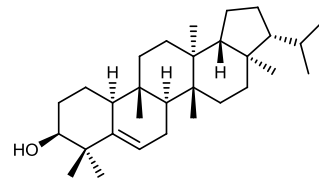
**EC-10** 4Z,8Z-  
matrikária- $\gamma$ -lakton



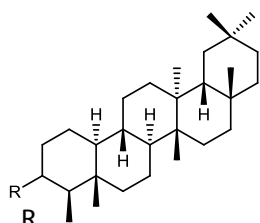
**EC-19**  
9,12,13-trihidroxi-10E-oktadecénsav



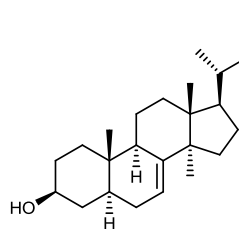
**EC-6** taraxerol



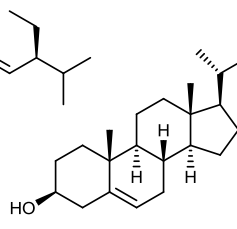
**EC-7** simiarenol



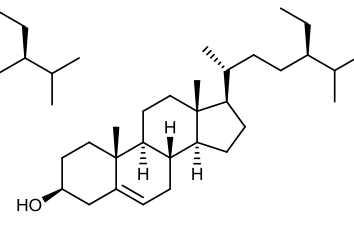
=O **EC-3** fridelin



**EC-5** spinaszterin

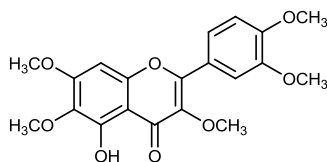


**EC-4** sztigmaszterin

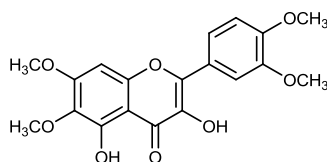


**EC-4**  $\beta$ -szitoszterin

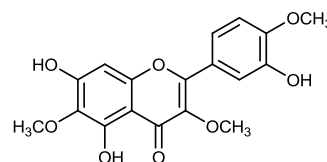
$\beta$ -OH **EC-1** epifridelanol



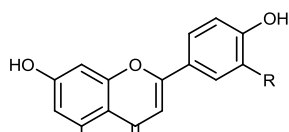
**AC-3** artemetin



**AC-5** kaszticin



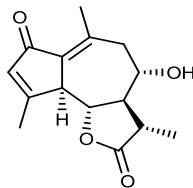
**AC-2** centaureidin



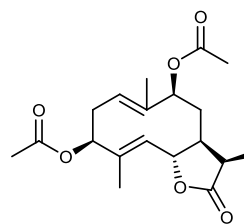
R

H **EC-14=AC-1** apigenin

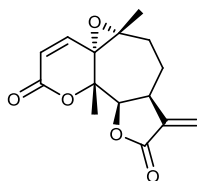
OH **AC-9** luteolin



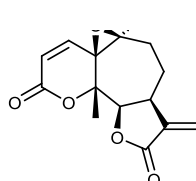
**AC-4** dezacetyl-matrikarin



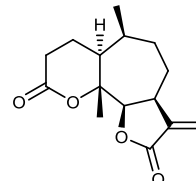
**AC-6** szintenin



**AC-7** paulitin



**AC-8** izopaulitin



**AC-11** pszilostachin C



#### 4.5. AZ IZOLÁLT VEGYÜLETEK FARMAKOLÓGIAI ÉRTÉKELÉSE

##### **A *Conyza canadensis* tartalomanyagai**

A betyárkórógyökérből izolált vegyületek hatását 3 daganatos (HeLa, MCF-7 és A-431) és egy normál (MRC-5) sejtvonalon vizsgálva (**1. táblázat**) megállapítottuk, hogy a biológiailag aktív vegyületek különböző vegyületcsoportokba sorolhatók (C<sub>10</sub> acetilének, piranonok, triterpének, szterinek és flavonok). A taraxerol, az epifridelanol, a 4Z,8Z-matrikária- $\alpha$ -lakton és az apigenin fejtette ki a legjelentősebb, a pozitív kontroll ciszplatinéval összevethető hatást. Bár a kloroformos kivonat csak mérsékelt aktivitású volt az előzetes szűrővizsgálatban, 3, farmakológiailag jelentős hatású vegyületet (konizapiranon A, konizapiranon B és apigenin) nyertünk ki belőle. A daganatterápia gyógyszerjelölt molekulái esetén, legyenek természetes vagy mesterséges eredetűek, a szelektív citotoxicitás igen fontos kritérium. Vizsgálatainkban a taraxerol, epifridelanol, spinaszterin és apigenin IC<sub>50</sub> értékei jóval jelentősebb toxicitást jeleznek a daganatos sejtekkel szemben, mint a normál MRC-5 sejtvonalon.

##### **Az *Achillea millefolium* s.l. tartalomanyagai**

A cickafarkfűből kinyert vegyületek 3 daganatos sejtvonalon történt vizsgálata (**1. táblázat**) alapján az antiproliferatív hatásért 2 vegyületcsoport, a flavonoidok és a szeszkviterpének tehetőek felelőssé. A leghatásosabb vegyület a centaureidin volt. A centaureidin analógja, az artemetin hatástalannak bizonyult, a 3-hidroxi és 3'-metoxi szubsztituenseket tartalmazó kaszticin egy nagyságrenddel gyengébb hatású volt. Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, amely szerint a C-3' és C-5 helyzetben hidroxilcsoporttal szubsztituált és a C-3 és C-4' helyzetben metoxifunkciót tartalmazó vegyületek rendelkeznek a legjelentősebb citotoxikus hatással. A szeszkviterpének közül a paulitin és az izopaulitin antiproliferatív hatása volt a legmarkánsabb. Mindkét vegyület 2  $\alpha,\beta$ -telítetlen molekularészt (C–O–CH=CH<sub>2</sub>) tartalmaz, amit a citotoxikus hatás feltételeként írtak le. A csak egy C–O–CH=CH<sub>2</sub> molekularészletet tartalmazó pszilosztachin C inaktív volt. Az epoxicsoport jelenléte és térhelyezete szintén jelentőséggel bír az antiproliferatív hatás szempontjából, mivel a sztereoizomer paulitin és izopaulitin aktivitása jelentősen eltér.

**1.táblázat** Az izolált vegyületek antiproliferatív hatása daganatos és normál sejteken

Vegyület		IC <sub>50</sub> érték (μM)			
		HeLa	MCF-7	A-431	MRC-5
EC-9	4E,8Z-Matrikária- $\alpha$ -lakton	24,46	18,74	22,81	73.75
EC-10	4Z,8Z-Matrikária- $\alpha$ -lakton	27,03	6,90	32,45	28.10
EC-16	Konizapiranon A	61,40	48,20	35,32	61.12
EC-15	Konizapiranon B	31,83	46,00	37,13	79.63
EC-19	9,12,13-Trihidroxi-10E-oktadecénsav	inaktív	inaktív	inaktív	nem vizsg.
EC-3	Fridelin	inaktív	inaktív	inaktív	nem vizsg.
EC-1	Epifridelanol	16,39	61,43	5,40	inaktív
EC-6	Taraxerol	inaktív	inaktív	2,65	inaktív
EC-7	Simiarenol	inaktív	inaktív	inaktív	nem vizsg.
EC-5	Spinaszterin	13,93	26,50	13,66	71.14
EC-14	Apigenin	10,64	13,88	12,34	> 100.00
EC-4	Sztigmaszterin+ $\hat{a}$ -szitoszterin	inaktív	inaktív	2,62*	11.31*

1. táblázat (folytatás)		HeLa	MCF-7	A-431	MRC-5
AC-7	Paulitin	4,76	1,96	1,48	nem vizsg.
AC-8	Izopaulitin	11,82	13,68	6,95	nem vizsg.
AC-11	Pszilostachin C	inaktív	inaktív	inaktív	nem vizsg.
AC-4	Dezacetil-matrikarin	inaktív	inaktív	inaktív	nem vizsg.
AC-6	Szintenin	inaktív	inaktív	inaktív	nem vizsg.
AC-3	Artemetin	inaktív	inaktív	inaktív	nem vizsg.
AC-5	Kaszticin	1,29	1,52	3,58	nem vizsg.
AC-2	Centaureidin	0,08	0,13	0,35	nem vizsg.
AC-1	Apigenin	10,64	13,88	12,34	nem vizsg.
AC-9	Luteolin	7,59	32,88	26,26	nem vizsg.
	Doxorubicin	0,15	0,28	0,15 (0,09*)	0,50 (0,29*)
	Ciszplatin	12,43	9,63	2,84 (0,85*)	4,11 (1,23*)

\*µg/ml

#### 4.6 KEMOTAXONÓMIAI ÉS BIOGENETIKAI SZEMPONTOK

A konizapiranon A-t és a konizapiranon B-t új természetes vegyületként azonosítottuk a betyárkóróban. A konizapiranonok C<sub>10</sub> telítetlen szénvázon alapuló és karboximetil funkciót tartalmazó szerkezete a C<sub>10</sub> acetilénnel, a *Conyza* nemzetség jellegzetes tartalomanyagaival való közeli rokonságra utal. Biogenetikai vizsgálatok szerint ezek a vegyületek a C<sub>18</sub> acetilénekből többlépéses β-oxidációval vagy közvetlen oxidációval keletkeznek. Feltételezések szerint a C<sub>10</sub> laktonok a C<sub>10</sub> acetilénsavakból vezethetők le, és más O-heterociklusok is hasonló módon bioszintetizálódhatnak. A konizapiranon A és B valószínűleg a lachnofillum-metilészter [CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(C≡C)<sub>2</sub>-CH=CH-COOCH<sub>3</sub>] prekursor ciklizációjával képződhet, amely folyamatban a molekula C-4–C-8 részlete érintett.

Azzal a várákozásunkkal ellentétben, amely szerint az *A. millefolium* daganatellenes komponensei flavonol és pszeudogvajanolid szerkezetűek, egy, a növény Japánban gyűjtött mintájának benzolos kivonatával végzett korábbi kísérlet 3 antiproliferatív hatású 1,10-szeko-gvajanolid, a metil-achimillát A, B és C azonosításával zárult. Ezek az eredmények az *A. millefolium* alakkör nagy morfológiai változatosságán túl kémiai variabilitására is rámutatnak.

A paulitint, az izopaulitint és a pszilostachin C-t elsőként izoláltuk az *Achillea* nemzetségben. Ezeket a szeko-pszeudogvajanolid típusú szeszkviterpén-laktonokat korábban csak *Ambrosia* fajokból írták le. Mivel a vegyületeket kereskedelmi forgalomból származó mintából izoláltuk, felvetődhet az a kérdés, hogy ezek az anyagok valóban a cickafarkfű másodlagos anyagcseretermékei vagy a növényi minta szennyezőiből származnak. A vegyületek viszonylag jelentős mennyisége azonban valószínűtlenné teszi ezt az eshetőséget.

A germakranolid típusú szintenin szerkezetvizsgálata meglepő eredménnyel zárult. Az AC-6 szerkezetét elsőként feltételezett millefint KASIMOV és mtsai 1972-ban az *A. millefolium*-ból írták le, de egyetlen későbbi vizsgálat sem igazolta jelenlétét a növényben. Jóllehet az AC-6 és a millefin <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C NMR adatai megegyeznek, a 2D NMR vizsgálataink a szintenin szerkezetet igazolták, és ez alapján a millefin jelenléte a cickafarkban kétséges.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A doktori munka a Szegedi Tudományegyetem Farmakognóziai Intézetében készült 2004-2012 között.

Köszönetemet és nagyrabecsülésemet fejezem ki témavezetőimnek, **Prof. Hohmann Judit**nak (a Farmakognóziai Intézet vezetője) és **Dr. Hajdú Zsuzsanna**nak munkám folyamatos irányításáért, szakmai tanácsaikért és az Intézetben eltöltött idő folyamán irányomban tanúsított emberségükért.

Szeretnék köszönetet mondani **Prof. Máthé Imréné**nek, a Farmakognóziai Intézet korábbi vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított munkám elvégzéséhez, valamint az MTA Ökológiai és Botanikai Kutatóintézetében termesztett *Artemisia* fajok rendelkezésre bocsátásáért.

Külön köszönet illeti az SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézetének munkatársait, **Dr. Zupkó Istvánt**, **Dr. Réthy Borbálát** és **Dr. Molnár Juditot** a farmakológiai vizsgálatok elvégzéséért.

Hálával tartozom **Dr. Rédei Tamás**nak (MTA Ökológiai Kutatóközpont Ökológiai és Botanikai Intézete, Vácrátót) és **Dr. Rédei Dóra**nak a növények begyűjtéséért és azonosításáért; **Dr. Forgó Péter**nek (SZTE Szerves Kémiai Tanszék) az NMR mérések elvégzéséért, **Dr. Kele Zoltán**nak (SZTE Orvosi Vegytani Intézet) és **Dr. Juhász Márta**nak (SZTE Gyógyszerkémiai Intézet) a tömegspektrometriás mérések elvégzéséért.

Köszönöm a Farmakognóziai Intézet munkatársainak munkámhoz nyújtott segítségét, különösen **Herkényé Nagy Anná**nak, aki a laboratóriumi munkában mindig értékes segítséget nyújtott. Szeretném megköszönni kollégáimnak **Dr. Vasas Andreá**nak és **Dr. Veres Katalinnak**, akik mindig készek voltak tanácsaikkal, támogatásukkal munkámat segíteni.

Köszönettel tartozom az *Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok* pénzügyi támogatásáért (OTKA 72771).

Külön köszönettel tartozom **Madarász Magdolná**nak a gyermekfelügyeletért, akinek segítsége nélkül a disszertációm nem születhetett volna meg.

Köszönöm családom támogatását, amely mindig biztos háttérül szolgált a munka elvégzése során.

## KÖZLEMÉNYJEGYZÉK

### AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Csupor-Löffler B**, Hajdú Z, Zupkó I, Molnár, J, Forgo, P, Vasas, A, Kele, Z, Hohmann, J.  
Antiproliferative constituents of the roots of *Conyza canadensis*  
*Planta Medica* 77: 1183-1188 (2011) IF (2010): **2,369**
2. **Csupor-Löffler B**, Hajdú Z, Réthy B, Zupkó I, Máthé I, Rédei T, Falkay G, Hohmann, J.  
Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part II  
*Phytotherapy Research* 23: 1109-1115 (2009) IF: **1,746**
3. **Csupor-Löffler B**, Hajdú Z, Zupkó I, Réthy B, Falkay G, Forgo P, Hohmann J.  
Antiproliferative Effect of Flavonoids and Sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on  
Cultured Tumour Cell Lines  
*Phytotherapy Research* 23: 672-676 (2009) IF: **1,746**
4. Réthy B, **Csupor-Löffler B**, Zupkó I, Hajdú Z, Máthé I, Hohmann J, Rédei T, Falkay G.  
Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part I  
*Phytotherapy Research* 21: 1200-1208 (2007) IF: **1,430**

### EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. Veres K, **Csupor-Löffler B**, Lázár A, Hohmann J.  
Antifungal activity and composition of essential oils of *Conyza canadensis* herbs and roots  
*The Scientific World Journal*; ID 489646; doi:10.1100/2012/489646 (2012) IF (2010): **1,524**
2. Hajdú Z, Forgo P, **Löffler B**, Hohmann J.  
Diterpene and norditerpene alkaloids from *Consolida orientalis*  
*Biochemical Systematics and Ecology* 33: 1081-1085 (2005) IF: **0,827**

### ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

1. Lajter I, **Csupor-Löffler B**, Zupkó I, Vasas A, Hohmann J.  
Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Onopordum acanthium*  
*8<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products*, Lublin (2012)
2. **Csupor-Löffler B**, Hajdú Z, Zupkó I, Molnár J, Forgo P, Kele Z, Hohmann J.  
New dihydropyranone derivatives and further antitumour compounds from *Conyza canadensis*  
*58<sup>th</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research*,  
Berlin (2010)
3. Veres K, **Csupor-Löffler B**, Lázár A, Hohmann J.  
Investigation of essential oils of *Conyza canadensis* herbs and roots  
*58<sup>th</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research*,  
Berlin (2010)

4. Martins A, Hajdú Z, Vasas A, **Csupor-Löffler B**, Molnár J, Hohmann J  
Spathulenol inhibits the human ABCB1 efflux pump  
*58<sup>th</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research*, Berlin (2010)
5. **Csupor-Löffler B.**  
Antiproliferatív hatású vegyületek izolálása Asteraceae fajokból  
*„Aikre büszkék vagyunk” Magyar Tudomány Ünnepe, MTA SZAB Gyógyszerészeti Szakbizottság és Műszaki Szakbizottság, Szeged (2009)*
6. **Csupor-Löffler B.**  
Daganatgátló vegyületek izolálása a betyárkóróból  
*Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak, Gyógynövénytudományi Szekció, Budapest (2009)*
7. Hohmann J, Hajdú Z, **Csupor-Löffler B**, Csapi B, Forgó P, Réthy B, Zupkó I.  
Tumorsejtek szaporodását gátló hatóanyagok izolálása Asteraceae fajokból  
*MTA Flavonoidkémiai Munkabizottságának tudományos ülése, Debrecen (2008)*
8. **Csupor-Löffler B**, Hajdú Z, Réthy B, Zupkó I, Falkay G, Forgó P, Hohmann J.  
Activity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Achilleae herba*  
*55<sup>th</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Graz (2007)*
9. Hajdú Z, **Csupor-Löffler B**, Hohmann J, Réthy B, Zupkó I, Falkay G, Máthé I.  
Magyarországon előforduló Asteraceae fajok *in vitro* antiproliferatív hatásának szűrővizsgálata  
*Anniversary Scientific Session, 15 years of Common Research on Medicinal Plants of the Romanian and Hungarian Academies, Marosvásárhely (2007)*
10. Zupkó I, Réthy B, **Csupor-Löffler B**, Hohmann J, Hajdú Zs, Ocsosvzki I, Falkay Gy.  
Magyarországi növényfajok citotoxikus hatású anyagainak vizsgálata  
*Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIII, Budapest (2006)*
11. **Csupor-Löffler B**, Hajdú Zs, Réthy B, Zupkó I, Forgó P, Hohmann J.  
A cickafarkfű citotoxikus anyagainak vizsgálata  
*XI. Magyar Gyógynövény Konferencia, Dobogókő (2005)*
12. Hajdú Z, **Csupor-Löffler B**, Hohmann J, Réthy B, Zupkó I, Falkay Gy, Máthé I.  
Az Asteraceae család Magyarországon előforduló fajainak *in vitro* citotoxicitási vizsgálata  
*XI. Magyar Gyógynövény Konferencia, Dobogókő (2005)*
13. Hajdú Z, **Csupor-Löffler B**, Hohmann J, Réthy B, Zupkó I, Falkay G, Máthé I.  
*In vitro* cytotoxicity of extracts from Hungarian Asteraceae  
*53<sup>rd</sup> Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Florence (2005)*
14. D. Csupor, **B. Löffler**, Zs. Hajdú, P. Forgó, J. Hohmann  
Alkaloids from Hungarian Ranunculaceae Species (P-53)  
*3<sup>rd</sup> International Symposium on Natural Drugs, Naples (2003)*
15. Hajdú Z, Csedő K, Forgó P, **Löffler B**, Hohmann J, Máthé I.  
Investigation of Diterpene Alkaloids of Ranunculaceae Species Native to Carpathian Basin  
*Medicinal Plant Research and Utilization, Kecskemét (2002)*