

**A *Tamus communis* és a *Xanthium italicum* antitumor
hatású vegyületeinek izolálása és szerkezetmeghatározása**

PhD értekezés tézisei

Kovács Adriána

Szegedi Tudományegyetem
Farmakognóziai Intézet

Szeged
2009

Bevezetés

A növényi és egyéb természetes eredetű vegyületek a gyógyszerkutatásban napjainkban is jelentős szerepet játszanak. Nemcsak gyógyszerjelöltek kifejlesztéséhez járulhatnak hozzá közvetlenül vagy mint modellek, hanem számos esetben új hatásmechanizmus felfedezését eredményezhetik, ezáltal elősegíthetik a körfolyamatban résztvevő sejtek és mechanizmusok jobb megértését. Ezen kívül a természetes anyagok kiindulási vegyületként szolgálhatnak a kombinatorikus kémiai vegyületek szintéziséhez.

Az elmúlt évtizedekben a természetes anyagok kutatása számos betegség, elsősorban különböző ráktípusok, rezisztens baktériumok és vírusok okozta betegségek, valamint immunszuppresszív rendellenességek terápiájában eredménnyel alkalmazható gyógyszerek felfedezését eredményezte. A forgalomba hozott kemoterapeutikumok mintegy kétharmad része természetes vegyület vagy annak felszintetikus származéka, illetve olyan molekula, amelyet bár szintetikus úton nyertek, kifejlesztésükhöz természetes vegyületek szolgáltak modellként, vezérmolekulaként (pl vinblasztin, vinkrisztin, paklitaxel, podofilotoxin, kamptotecin).

Napjainkban, a tumorelles szerek kutatásának egyik legérdekesebb területét alkotják a *cis*-stilben szerkezetű kombretasztatinok. A leghatásosabb vegyület a Dél-Afrikában honos *Combretum caffrumból* izolált kombretasztatin A-4, amely nátrium-foszfát prodrug formájában jelenleg klinikai vizsgálatok alatt áll, és az eredmények alapján hatásosnak mutatkozik különböző szolid tumorok (ovárium-, kolorektális- és gasztrointesztinális-, tüdő- és méhnyakrák) esetén, beleértve a multidro-g-rezisztens rákos megbetegedéseket is.

Az alkoxi-szubsztituált fenantréneket, amelyek a *cis*-stilbének konformációsán gátolt analógjai, még nem vizsgálták részletesen, de szerkezetbeli hasonlóságuk miatt, mint lehetséges tumorelles szerek reményt keltőek.

Egy másik jelentős vegyületsoprotot alkotnak a szeszviterpének, amelyek pl. az Asteraceae növénycsalád fajainak föld feletti részében nagy mennyiségben halmozódnak fel, és korábbi közlemények szerint citotoxikus hatással rendelkeznek. A *Xanthium* nemzetség néhány fáját a népi gyógyászatban különböző rákos megbetegedések esetén alkalmazták. Farmakológiai vizsgálatokban kivonataik és

szeszviterpén komponenseik magas aktivitást mutattak számos humán eredetű tumorsejt vonalon.

A Szege-di Tudományegyetem Farmakognóziái Intézetében Prof. Hohmann Judit vezetésével, a Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézettel együttműködésben már évek óta folyik gyógynövények antitumor hatású vegyületeinek izolálása és szerkezetmeghatározása. Ezen kutatások részeként munkám a *Tamus communis* L. (pirítógyökér) és a *Xanthium italicum* Moretti (olasz szerbtövis) növénykémiai vizsgálata volt. Jelen tézis ennek a fitokémiai munkának az eredményeit foglalja össze.

Céltűzések

Munkánk célja a *T. communis* és a *X. italicum* vegyületeinek hatásvezérelt izolálása, szerkezetmeghatározása és antitumor hatásuk értékelése volt, amelynek érdekében a következő feladatokat végeztük el:

- Növényi nyersanyag begyűjtése
- A *T. communis* és *X. italicum* proliferációgátló hatásának szűrővizsgálata különböző tumor sejtvonalonak
- A növényi nyersanyag kivonása
- Az aktív kivonatok biológiai hatáskövetéssel történő frakcionálása és a hatáért felelős vegyületek izolálása, tisztítása különböző kromatográfiás módszerek (OCC, VLC, CPC, preparatív TLC, gélkromatográfia és HPLC) kombinálásával
- Az izolált vegyületek szerkezetmeghatározása spektroszkópiái módszerek (UV, NMR, HREIMS) segítségével
- Az izolált vegyületek biológiai hatásvizsgálata

Alkalmazott módszerek

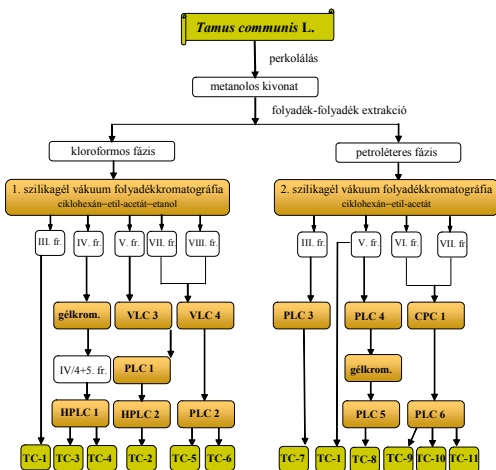
A kivonatok és a tiszta vegyületek antiproliferatív hatásának vizsgálata HeLa (cervix), A431 (bőr) és MCF7 (emlő) tumoros sejtvonalonak, MTT teszt alkalmazásával történt. A vegyületek tisztítását többlépes izolálási eljárás segítségével végeztük különféle extrakciós és kromatográfiás módszerek felhasználásával; oszlopkromatográfiát (OCC), vákuum folyadékromatográfiát (VLC), preparatív

rétegekromatográfiát (PLC) és nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiát (NP-HPLC, RP-HPLC) alkalmaztunk. Az izolált vegyületek szerkezetmeghatározása UV-spektroszkópia, nagyfelbontású tömegspektroszkópia (HR-MS), valamint mágneses magrezonancia-spektroszkópia (NMR) segítségével történt.

Eredmények

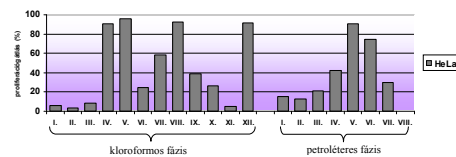
A fenantrének és xantanolidok izolálása biológiai hatáskövetéssel

A *Tamus communis* friss rizómáját metanollal, szobahőmérsékleten perkoláltuk (1. ábra). A kivonatot betöményítést követően petroléterrel és kloroformmal extraháltuk. A szerves fázisok citotoxikus aktivitását HeLa sejtvonalon MTT teszt alkalmazásával vizsgáltuk. Mindkét frakció magas, koncentrációfüggő hatást mutatott, ezért további fitokémiai vizsgálatoknak vetettük alá.



1. ábra. Fenantrének izolálása a *T. communis*ből

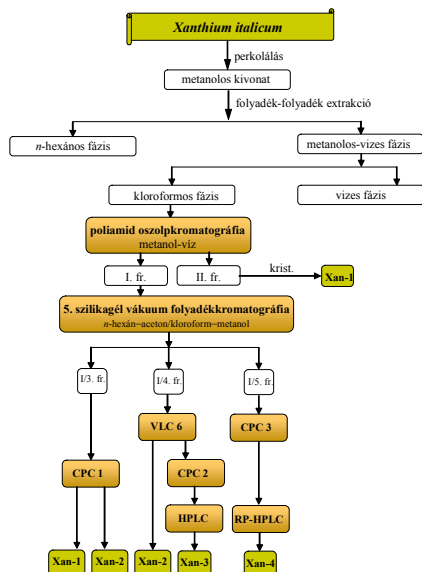
A kloroformos és petroléteres fázisokat vákuum-folyadékkromatográfiával szilikagélén frakcionáltuk, így a komponenseket polaritásuk szerint választottuk el. Ez a kromatográfiás lépés a fő komponensek durva elválasztását tette lehetővé. A frakcionálást vékonyrétegekromatográfiával ellenőriztük, majd egyesítést követően a kloroformos fázisból tizenkét, a petroléteres fázisból pedig nyolc fő frakciót nyertünk, amelyek citotoxikus hatását HeLa sejtvonalon teszteltük (2. ábra).



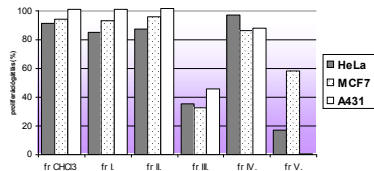
2. ábra. A *T. communis* VLC frakcióinak antiproliferatív aktivitása HeLa sejtvonalon

A kloroformos fázis esetén a IV, V, VIII és XII jelzésű, a petroléteres fázis esetén pedig az V és VI frakció mutatott magas aktivitást.

A *Xanthium italicum* esetén az eltérő fejlődési stádiumban gyűjtött, szárított és porított növényi részeket (gyökér, virág, szár és levél), metanollal perkolálással vontuk ki. Betöményítést követően a kivonatokhoz vizet adtunk és folyadék-folyadék megosztást végeztünk *n*-hexánnal és kloroformmal. Az így nyert frakciók és az eredeti metanolos kivonat tumorsejt szaporodást gátló hatását HeLa, A431 és MCF7 sejtvonalakon vizsgáltuk. Az eredmények azt mutatták, hogy a virágzás alatt gyűjtött növény extraktuma magasabb aktivitással rendelkezik és a hatóanyagok a virágban és a levélben dúsultak fel. A levélből készült kloroformos frakció mindhárom sejtvonalon kiemelkedően hatékonynak bizonyult, így a továbbiakban ennek feldolgozását végeztük. A kísérlet következő fázisában a szárított leveleket dolgoztuk fel. Metanolos kivonást követően folyadék-folyadék megosztást végeztünk *n*-hexánnal, kloroformmal és vízzel. Ezután egy speciális tisztítási eljárást alkalmaztunk poliamid oszlopon. Az elúciót MeOH–H₂O gradiens eleggyel végeztük, amely klorofill-mentes, xantanolidokban gazdag frakciókat eredményezett (3. ábra). Vákuum-folyadék-kromatográfiás elválasztást követően kevésbé összetett frakciókhoz jutottunk. Ezeket vékonyrétegekromatográfiás ellenőrzés alapján egyesítettük, így öt fő frakciót nyertünk, amelyek közül farmakológiai vizsgálatot



3. ábra. Xantanolidok izolálása a *X. italicum*ból



4. ábra. *X. italicum* levél kloroformos frakcióinak antiproliferatív aktivitása HeLa, MCF7 és A431 sejtvonalon

követően az I, II és IV jelzésű mutatott figyelemre méltó sejtnövekedés-gátló hatást (4. ábra). Az I. frakciót ismételt VLC-nak vetettük alá, amelynek eredményeként tíz alfrakciót nyertünk (I/1-10), ezek aktivitását HeLa, MCF-7 és A431 sejteken vizsgáltuk. Az I/2, I/3, I/4 és I/5 jelzésű frakciók szignifikáns hatást mutattak.

A következő lépésekben mindkét növény esetén egyre szelektívebb módszereket, gélkromatográfiát, centrifugális planárkromatográfiát (CPC), preparatív vékonyrétegekromatográfiát (preparatív TLC) és nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC) alkalmaztunk a hatásos frakciók tisztítására. Az egymást követő tisztítási lépések során különböző álló- és mozgófázisokat alkalmaztunk. A preparatív vékonyrétegekromatográfia és a gélkromatográfia a néhány fő komponenset tartalmazó frakciók tisztítása esetén bizonyult alkalmazhatónak. A normál- és fordított fázisú HPLC elválasztást kis tömegű frakciók tisztítására alkalmaztuk. Ez az on-line elválasztási technika a vegyületek kiméletes körülmények közötti izolálását tette lehetővé.

Az elválasztástechnikai módszerek kombinált alkalmazásával a sokkomponensű mintákból tizennégy vegyületet nyertünk: a *T. communis*ből a β -szitoszterinen (TC-1) kívül tíz fenantréntípusú (TC-2–TC-11) (1-10), a *X. italicum*ból pedig négy xantanolidvázis vegyületet (Xan-1–Xan-4) (11-14) izoláltunk.

Az izolált vegyületek szerkezetmeghatározása

Az izolált vegyületek amorf, kristályos, olajos konzisztenciájú vagy gumiszerű anyagok. Az vegyületek szerkezetét spektroszkópiai módszerek segítségével határoztuk meg. A *T. communis*ből izolált komponensek esetén az UV spektrumok fenantrénváz jelenlétére utaltak. A HREIMS adatokból a molekulaösszetételt határoztuk meg. A vegyületek szerkezetére utaló legértékesebb információt az 1D és 2D NMR spektroszkópia (¹H-¹H COSY, NOESY, HSQC és HMBC) szolgáltatta. Az NMR vizsgálatok eredményeként elvégeztük a TC-5 (4), TC-7 (6), TC-10 (9), TC-11 (10) és Xan-1–Xan-4 (11-14) jelzésű vegyületek esetén a teljes ¹H és ¹³C jelhozzárendeléseket. A fenantréneknél a szubsztituensek helyzetét, a xantanolidok esetén pedig az asszimetriacentrumok relatív konfigurációját NOESY vizsgálatok alapján határoztuk meg.

A *T. communis* rizómájának lipofil frakciójából kilenc fenantrén (1-6, 8-10) és egy 9,10-dihydrofenantrén típusú (7) vegyületet azonosítottunk. Valamennyi vegyület monomer szerkezetű, és hidroxil- illetve alkoxi-szubsztituált. A 2,3,4-trimetoxi-7,8-metiléndioxi-fenantrén (6) és a 3-hidroxi-2,4-dimetoxi-7,8-metiléndioxi-fenantrén (9) C7–C8 helyzetű metiléndioxi csoportot tartalmaz. A 7-hidroxi-2,3,4-trimetoxi-fenantrén (2) és a 7-hidroxi-2,3,4,8-tetrametoxi-fenantrén (10) új természetes anyagok, további öt vegyületet pedig [nudol (1), konfuzarin (3), 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxi-fenantrén (4), 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxi-fenantrén (5) és 2-hidroxi-3,5,7-trimetoxi-9,10-dihydrofenantrén (7)] elsőként írtunk le a piritógyökérből.

A *X. italicumból* izolált xantatin (11), 4-epixanthanol (12), 4-epi-isoxanthanol (13) és 2-hidroxi-xantinozin (14) a szeszkviterpén-laktonok csoportjába tartozik; közülük a 2-hidroxi-xantinozin (14) elsőként írtuk le a növényből.

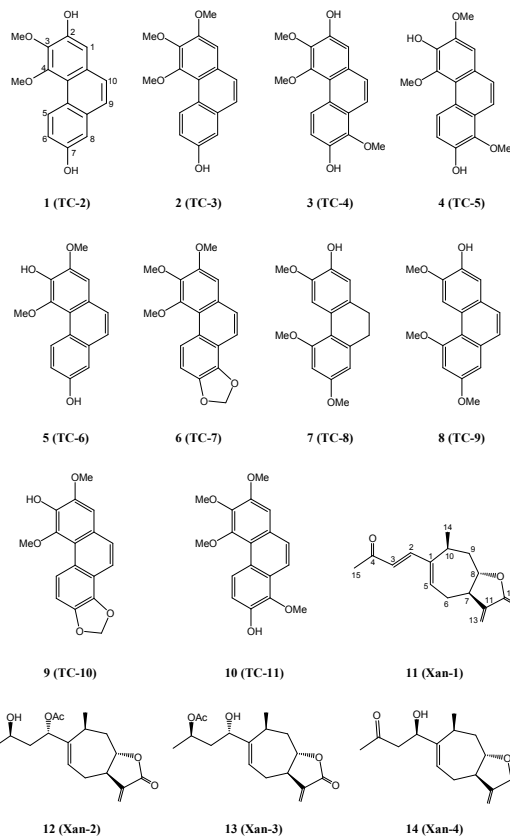
Az izolált vegyületek biológiai aktivitása

Az izolált fenantrének citotoxikus aktivitását HeLa sejteken tesztelték az SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézetében. A konfuzarin (3) mutatta a legerősebb hatást ($IC_{50} = 0,97 \pm 0,009 \mu M$), ezt követte a 3-hidroxi-2,4-dimetoxi-7,8-metiléndioxi-fenantrén (9) ($IC_{50} = 3,64 \pm 0,12 \mu M$) és a 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxi-fenantrén (5) ($IC_{50} = 6,66 \pm 0,25 \mu M$).

A 2,7-dihidroxi-3,4-dimetoxi-fenantrén (1), a 7-hidroxi-2,3,4-trimetoxi-fenantrén (2), a 2-hidroxi-3,5,7-trimetoxi-9,10-dihydrofenantrén (7), a 2-hidroxi-3,5,7-trimetoxi-fenantrén (8) és a 7-hidroxi-2,3,4,8-tetrametoxi-fenantrén (10) figyelemre méltó sejtnevedés-gátló hatást mutatott ($IC_{50} = 8,52-20,18 \mu M$), míg a 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxi-fenantrén (4) és a 2,3,4-trimetoxi-7,8-metiléndioxi-fenantrén (6) inaktívnak bizonyult.

Bár az izolált vegyületek kis száma nem nyújtott lehetőséget a szerkezet-hatás összefüggések részletes analizására, az eredményekből következtetni lehetett néhány, a sejtproliferáció gátló hatáshoz szükséges szerkezeti elemre.

- A metoxicsoportok száma és helyzete a fenantrénvázon a hatékonyság tekintetében döntő tényező, a konformációsán kevésbé gátló analógokhoz, a *cis*-stilbén kombretaszationhoz hasonlóan. Noha a jelentős aktivitással rendel-



kező kombretaszatinok esetén nélkülözhetetlen a trimetoxi-szubsztituált benzolgyűrű jelenléte a molekulában, eredményeink azt mutatják, hogy a fenantrén esetében ez nem szükséges, mivel a vizsgálatok során a három metoxicsoporttal szubsztituált TC-7 (6) bizonyult a legkevésbé aktívnak ($IC_{50} = >30 \mu M$), míg a leghatásosabb a mindössze két metoxicsoportot tartalmazó TC-4 (3) ($IC_{50} = 0,97 \pm 0,009 \mu M$) és TC-10 (9) ($IC_{50} = 3,64 \pm 0,12 \mu M$) jelzésű vegyület volt.

- A 3, 6, 9 és 10 jelzésű komponensek hatékonyságát összehasonlítva megállapítható, hogy a hidroxilcsoport jelenléte akár az A, akár a B gyűrűn kedvezőbb, mint a teljes alkoxiszubsztitúció.
- A citotoxikus hatáshoz nem szükséges a C9–C10 helyzetű kettős kötés, mivel a 2-hidroxi-3,5,7-trimetoxi-9,10-dihydrofenantrén (7) ($IC_{50} = 14,21 \pm 1,64 \mu M$) és a 2-hidroxi-3,5,7-trimetoxifenantrén (8) ($IC_{50} = 11,49 \pm 0,68 \mu M$), amelyek csak az utóbbi szerkezeti elemekben különböznek egymástól, szinte egyformán aktívak.

Megfigyeléseink bizonyítják, hogy a kombretaszatinok esetén megállapított szerkezet-hatás összefüggések nem alkalmazhatók közvetlenül a szerkezetileg hasonló vegyületekre, pl. a konformációsan gátolt fenantrénekre.

Az izolált xantanolidok citotoxikus hatását három humán sejtvonalon (HeLa, A431 és MCF7) vizsgálták. A legmagasabb aktivitást mindhárom tesztrendszerben a xantatin (11) ($IC_{50} = 3,44\text{--}8,00 \mu M$) mutatta, míg a 2-hidroxi-xantoinozin (14) HeLa sejteken fejtett ki szignifikáns hatást ($IC_{50} = 7,78 \pm 1,21 \mu M$). A 4-epixantanol (12) és a 4-epi-izoxantanol (13) mérsékelt aktivitást mutatott mindhárom sejtvonalon ($IC_{50} = 15,53\text{--}37,62 \mu M$). Minden izolált xantanolidvázis vegyület (11-14) α -metilén- γ -laktongyűrűt tartalmaz a molekulában, amely irodalmi adatok alapján a citotoxikus hatás létrejöttének egyik feltétele. A leghatásosabb komponens, a xantatin (11) esetén egy α,β -telítetlen kettőskötés is található az oldalláncban. Ez a szerkezeti rész valószínűleg fokozza az antitumor aktivitást.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a természetben előforduló fenantrének, dihydrofenantrének és xantanolidok igéretes kiindulási vegyületei lehetnek antitumor hatású gyógyszerek kifejlesztésének.

Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom Dr. Hohmann Judit professzor asszonynak, az SZTE Farmakognóziai Intézet tanszékvezetőjének és témavezetőmnek a munkám során nyújtott iránymutatásért.

Őszinte köszönetemet fejezem ki Dr. Vasas Andreának a kísérletes munka során adott tanácsaiért, őszinte támogatásáért és az értekezés megírásában nyújtott segítségért.

Köszönettel tartozom továbbá Prof. Dr. Szabó Gy. Lászlónak és Böszörményi Anikónak a növényi nyersanyag begyűjtésében és azonosításában nyújtott segítségéért, Dr. Forgó Péternek az NMR spektrumok felvételéért, Dr. Szabó Pálnak a tömegspektroszkópiás mérésekért, valamint Dr. Zupkó Istvánnak a farmakológiai vizsgálatok elvégzéséért.

Hálás vagyok Berta Erzsébet laborasszisztensnek, valamint kollégáimnak és barátaimnak az SZTE Farmakognóziai Intézetében, hogy hozzájárultak kísérletes munkám elvégzéséhez és az értekezés összeállításához.

Köszönöm Családom szeretetét és türelmét.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Réthy B, Kovács A, Zupkó I, Forgo P, Vasas A, Falkay Gy, Hohmann J. Cytotoxic phenanthrenes from the rhizomes of *Tamus communis* *Planta Med.* **72**, 767-770 (2006)
IF: 1.848
2. Kovács A, Forgo P, Zupkó I, Réthy B, Falkay Gy, Szabó P, Hohmann J. Phenanthrenes and a dihydrophenanthrene from *Tamus communis* and their cytotoxic activity *Phytochemistry* **68**, 687-691 (2007)
IF: 2.322
3. Kovács A, Vasas A, Hohmann J. Natural phenanthrenes and their biological activity *Phytochemistry* **69**, 1084-1110 (2008)
IF: 2.322
4. Kovács A, Vasas A, Forgo P, Réthy B, Zupkó I, Hohmann J. Xanthanolides with Antitumour Activity from *Xanthium italicum* *Z. Naturforschung* (in press)
IF: 0.756

Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások

1. Kovács A. Citotoxikus fenantrének a *Tamus communis*-ből *Tudományos Diákköri Konferencia, SZTE GYTK – ÁOK* Szeged, 2005. február
2. Kovács A. Citotoxikus fenantrének a *Tamus communis*-ből *XXVII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Orvostudományi szekció, Gyógyszerésztudományi tagozat* Szeged, 2005. március 23.
4. Kovács A. Tumorsejtek szaporodását gátló fenantrének izolálása a *Tamus communis*-ből *VIII. Clauder Otó Emlékverseny* Budapest, 2007. április 12-13.

5. Réthy B, Kovács A, Zupkó I, Hohmann J, Falkay Gy. A *Tamus communis*-ből izolált fenantrének citotoxikus hatásának vizsgálata *in vitro* *Semmelweis Egyetem PhD Tudományos napok 2005.* Budapest, 2005. április 14.
6. Vasas A, Rédei D, Kovács A, Forgo P, Zupkó I, Réthy B, Falkay Gy, Hohmann J. Cytotoxic phenanthrenes from the rhizomes of *Tamus communis* L. *53rd Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research* Firenze, 2005. augusztus 21-25.
7. Kovács A, Vasas A, Rédei D, Forgo P, Zupkó I, Réthy B, Falkay Gy, Szabó L Gy, Hohmann J. A piritógyökér (*Tamus communis* L.) citotoxikus hatású anyagai *XI. Magyar Gyógynövény Konferencia* Dobogókő, 2005. október 13-15.
8. Kovács A, Vasas A, Réthy B, Zupkó I, Forgo P, Hohmann J. Citotoxikus fenantrének izolálása a *Tamus communis* L.-ből *Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIII.* Budapest, 2006. május 25-27.
9. Kovács A, Vasas A, Réthy B, Zupkó I, Forgo P, Hohmann J. Citotoxikus xanthanolidok izolálása a *Xanthium italicum* L.-ből *X. Tavaszi Szél Konferencia* Budapest, 2007. május 17-20.
10. Kovács A, Vasas A, Zupkó I, Réthy B, Forgo P, Hohmann J. Antitumor activity of xanthanolides from *Xanthium italicum* Moretti *55th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research* Graz, 2007. szeptember 2-6.
11. Kovács A, Vasas A, Réthy B, Zupkó I, Forgo P, Hohmann J. Antiproliferatív hatású szeszkviterpének a *Xanthium italicum*-ból *Gyógynövény Szimpózium* Szeged, 2007. október 18-19.