

Lignánok vizsgálata a fészekvirágzatúak családjából kiválasztott fajok kaszattermésében

Doktori értekezés

Sólyomváry Anna

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Boldizsár Imre, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Csupor Dezső, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Völgyi Gergely Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás, D.Sc., professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Papp Nóra, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Ludányi Krisztina, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2015

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	6
2. Irodalmi áttekintés.....	8
2.1. Lignánok (Li-ok), neolignánok (NeLi-ok) és szeszkvineolignánok (SeNeLi-ok) szerkezete és bioszintézise	8
2.2. Sztereoekémia	12
2.3. A lignánok hidrolízise	13
2.4. A lignánok hatásai	15
2.4.1. A dibenzilbutirolakton (DBBL) csoportba tartozó Li-ok hatásai.....	16
2.4.2. A NeLi és SeNeLi csoportba tartozó lignánok hatásai	19
2.5. A Li, NeLi és SeNeLi típusú anyagcseretermékek előfordulása a növényvilágban	19
2.6. A <i>Cynareae</i> – bogáncs nemzetségcsoport vizsgált fajai és ismert összetevőik	21
3. Célkitűzések	23
4. Anyagok és módszerek.....	24
4.1. Növényminták	24
4.2. Reagensek, oldószerek	24
4.3. Kromatográfias módszerek	24
4.3.1. HPLC-UV MS/MS és TOF MS vizsgálatok.....	24
4.3.2. Gázkromatográfia-tömegspektrometria (GC-MS)	25
4.4. NMR spektroszkópia	25
4.5. Kvantitatív meghatározás.....	26
4.6. Abszolút konfiguráció meghatározása geometriai és termokémiai számítással	26
4.7. A termés részeinek szétválasztása csíráztatással	27

4.8.	Enzimes hidrolízis.....	27
4.9.	Kivonatok készítése	27
4.10.	Savkezelés	27
4.11.	SW480 vastagbél-daganatsejtekre kifejtett hatások vizsgálata	28
4.11.1.	Sejtosztódás gátlás vizsgálata szulfurodamin-B (SRB) módszerrel.....	28
4.11.2.	Mikrotubulusok vizualizációja immuncitokémiával	29
4.11.3.	Az apoptotikus folyamatok és sokmagvú óriássejtek képződésének FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) módszerrel történő vizsgálata	29
4.11.4.	A Wnt/ β -katenin jelátviteli útban szereplő fehérjék, valamint a β -tubulin Western-blot módszerrel történő meghatározása	29
5.	Eredmények	30
5.1.	A <i>Leuzea carthamoides</i> termésének összetétele.....	30
5.2.	A <i>Cirsium brachycephalum</i> – kifestő aszat és a <i>Serratula tinctoria</i> – festő zsoldina termések vizsgálata.....	37
5.3.	A <i>Cirsium vulgare</i> – közönséges aszat termésének összetétele	42
5.4.	A <i>Cirsium eriophorum</i> - gyapjas aszat termésének összetétele	48
5.5.	A <i>Cnicus benedictus</i> – benedekfű termésének összetétele	55
5.6.	Izolált összetevők hatása SW480 vastagbél-daganatsejtekre in vitro	61
5.6.1.	A sejtosztódás gátlása	61
5.6.2.	A sejtosztódás gátlás mechanizmusának vizsgálata - Wnt/ β -katenin jelátviteli út befolyásolása.....	62
5.6.3.	A mikrotubuláris rendszerre kifejtett hatások	64
5.6.3.1.	Sokmagvú óriássejtek képződése és apoptózis fokozása.....	64
5.6.3.2.	Mikrotubulus rendszer gátlása.....	65
6.	Megbeszélés	68

6.1.	A tanulmányozott termékek összetételének összehasonlítása az azonosított vegyületek növényvilágbeli előfordulásával	68
6.2.	Az összetevők termésrész-specifikus felhalmozódásának jelentősége.....	69
6.3.	Az enzim- és a savkezelések eredményének jelentősége az összetevők minőségi és mennyiségi meghatározásában és izolálásában	70
7.	Következtetések.....	72
7.1.	Termésrészek és kezelések	72
7.2.	Daganatgátló hatások.....	73
8.	Összefoglalás	74
9.	Summary	75
10.	Irodalomjegyzék.....	76
11.	A szerző publikációinak jegyzéke	85
12.	Köszönetnyilvánítás.....	87

Rövidítések jegyzéke

^{13}C NMR	-	szén 13 mágneses magrezonancia
^1H NMR	-	hidrogén mágneses magrezonancia
ACN	-	acetonitril
CD	-	cirkuláris dikroizmus
CDCl_3	-	deuterált kloroform
CID	-	ütközés-indukált disszociáció
COSY	-	Correlation Spectroscopy
DBBL	-	dibenzilbutirolakton
$\text{DMSO-}d_6$	-	deutrált dimetilszulfoxid
DP	-	vezető fehérje
ESI	-	elektronspray ionizáció
FACS	-	Fluorescence-Activated Cell Sorting
GC-MS	-	gázkromatográfia-tömegspektrometria
GSK3	-	glikogén szintáz kináz 3
HMBC	-	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMDS	-	hexametildiszilazán
HPLC-MS	-	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia-tömegspektrometria
HRP	-	torma peroxidáz
HSQC	-	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Li	-	lignán
NeLi	-	neolignán
NMR	-	mágneses magrezonancia spektroszkópia
NOE	-	Nuclear Overhauser Effect
RSD	-	relatív standard deviancia
SeNeLi	-	szeszkvineolignán
SRB	-	szulfrodamin-B
TeMS	-	tetrametil szilán
TFES	-	trifluorecetsav
TMS	-	trimetilszilil
TOCSY	-	Total Correlation Spectroscopy
TOF (MS)	-	repülési idő analizátor (time of flight) tömegspektrometria

1. Bevezetés

A felépítő és lebontó folyamatok nagy része – mint elsődleges (primer) anyagcsere – a növényekben azonos módon zajlik le. Ennek termékeiből kiindulva ugyanakkor a növényekben egy fajra, vagy nagyobb rendszertani egységekre (pl. családra) jellemző másodlagos (szekunder) anyagcsere is megfigyelhető a növények kémiai összetételének rendkívüli változatosságát eredményezve. A másodlagos anyagcsere-termékek egy része kórokozók, kártevők ellen véd, jelentős részük pontos szerepét a növények életében azonban nem ismerjük. A növénykémiai és hatástani vizsgálatok számos másodlagos anyagcsere-termék gyógyászati értékét bizonyították, a növényi eredetű hatóanyagok a gyógyászat számos területén nélkülözhetlenné váltak (pl. taxol daganatellenes, kinin maláriaellenes hatása). Mivel a földön élő növényfajok mindössze kb. 5%-áról rendelkezünk részletesebb kémiai ismeretekkel, ezért a még nem, vagy kevéssé vizsgált fajok növénykémiai jellemzése nagy jelentőséggel bír: új molekulák vagy már ismert összetevők új forrásai kerülhetnek azonosításra, bővítve a gyógyászatilag értékes anyagcsere-termékek számát.

Doktori munkám során fenilpropán egységekből felépülő lignán (Li), neolignán (NeLi) és szeszkvineolignán (SeNeLi) csoportokba tartozó növényi másodlagos anyagcsere-termékeket tanulmányoztunk kémiai (kromatográfias és spektroszkópiás módszerekkel) és hatástani (daganatsejtek sejtosztódásának gátlása *in vitro*) szempontból a fészekvirágzatúak (Asteraceae) családjába tartozó bogáncs – *Cynareae* (*Carduae*) – nemzetségcsoport olyan fajaiban, melyek összetétele nem, vagy kevéssé ismert. A bogáncs nemzetségcsoport kiválasztását kemotaxonómiai eredmények támasztják alá: a kérdéses anyagcsere-termékek a rokonsági kör több fájában, főleg a termésekben kerültek azonosításra. A vizsgálatainkhoz olyan fajokat választottunk, melyek Magyarországon vadon élnek (*Cirsium brachycephalum* – kiséfű aszat, *C. eriophorum* – gyapjas aszat, *C. vulgare* – közönséges aszat, *Serratula tinctoria* – festő zsoltina), vagy természetesen (*Cnicus benedictus* – benedekfű, *Leuzea carthamoides*), így a szükséges növényi nyersanyag viszonylag egyszerűen beszerezhető. Vizsgálataink során két új természetes vegyület (a NeLi prebalanofonin és a SeNeLi prepikrazmalignán) szerkezetbizonyítása mellett 13 ismert szerkezetű összetevő (a Li-ok csoportjából a dibenzilbutirolakton (DBBL) szerkezetű arctiin, arctigenin, kartamozid, kartamogenin, matairezinol, trahelozid, trahelogenin; a SeNeLi-ok közül

lappaol A és C, izolappaol A és C, illetve pikrazmalignán; valamint a NeLi balanofonin) új forrásait azonosítottuk. Az összetevők átalakítására (hidrolízis és ciklizáció) kezelési módszereket (savas és enzimátikus kezelés) optimalizáltunk. Ezeket a módszereket és a termésrészek (termésfal és embrió) elkülönítését felhasználva mindegyik vegyület izolálásához új, optimális nyersanyagforrást és körülményeket találtunk. Így a kérdéses összetevőket a lehető legnagyobb mennyiségben, zavaró szennyezők jelenléte nélkül, tiszta formában izolálhattuk szerkezetbizonyítás és hatástani vizsgálatok céljára.

Az általunk azonosított összetevők többsége és rokon vegyületeik (pl. podofillotoxin) számottevő mértékű daganatellenes hatásokkal rendelkeznek. Erre alapoztuk hatástani vizsgálatainkat, mellyel a rendelkezésünkre álló vegyületek közül először bizonyítottuk a kartamogénin sejtosztódást gátló hatását, valamint a trahelogenin és arctigenin sejtosztódást gátló hatásának még nem ismert mechanizmusait.

2. Irodalmi áttekintés

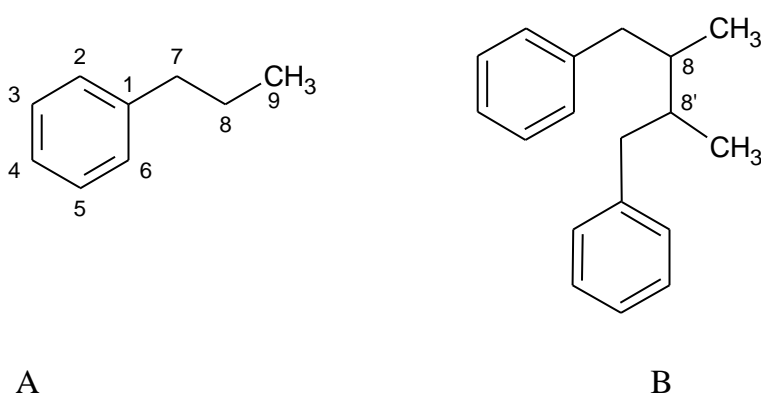
2.1. Lignánok (Li-ok), neolignánok (NeLi-ok) és szeszkvineolignánok (SeNeLi-ok) szerkezete és bioszintézise

A lignánok a fenoloidok csoportjába tartozó másodlagos anyagcseretermékek. Jelentőségük a növény szempontjából még nem teljesen ismert, de valószínűleg a kórokozók elleni védelemben játszanak szerepet [1]. Ezt alátámasztja kórokozók (gomba, baktérium és vírus) elleni hatásuk [2]. Ezek mellett hormonszerű aktivitással is rendelkeznek, ami miatt lárvanövekedést és vedlést gátló anyagok, ezért természetes peszticidnek tekinthetők [3].

Fenilpropán egységekből (1.A ábra) épülnek fel. Három csoportjukat aszerint különböztük el, hogy

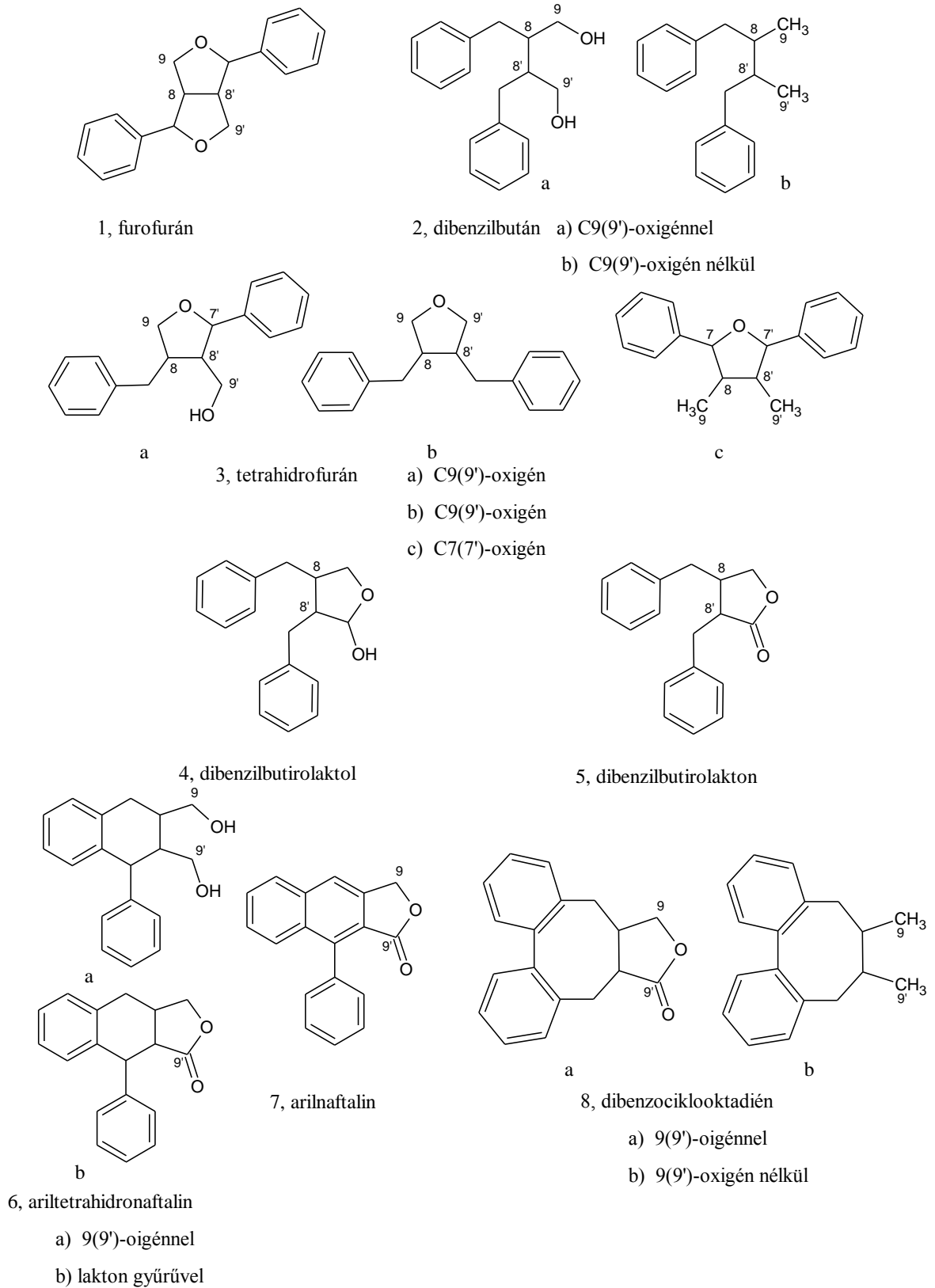
- 1.) hány fenilpropán egység építi fel őket, és
- 2.) ezek mely szénatomjai között alakul ki a kötés.

A szűkebb értelemben vett Li-okban két C_6C_3 (fenilpropán) egység kapcsolódik a C8 és a C8' atomok között kialakuló kötéssel (1.B ábra). Ha a két C_6C_3 nem C8-C8' kötéssel kapcsolódik, akkor NeLi alakul ki. Három C_6C_3 kapcsolódásával jönnek létre a SeNeLi-ok [1,4].



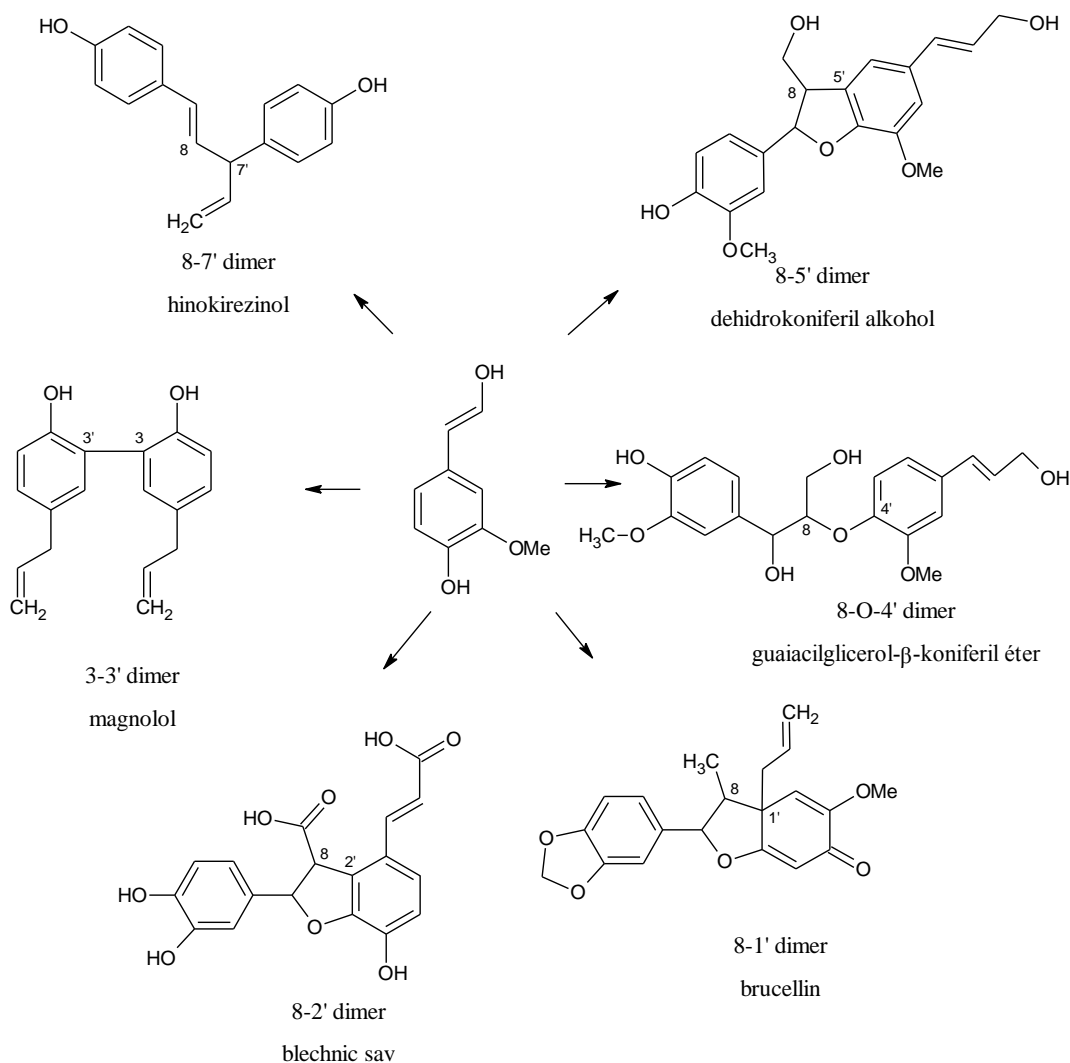
1. ábra. A lignán, neolignán és szeszkvineolignán szerkezeteket felépítő fenilpropán (C_6C_3) egység (A) és két C_6C_3 -ból 8C-8'C kapcsolódással létrejövő lignán alapváz (B).

A létrejött alapváz szerkezete alapján a Li-ok 8 csoportja ismert (2. ábra) [2,5].



2. ábra. A lignánok típusai [6].

A NeLi-okat felépítő két C_6C_3 jellemző kapcsolódási lehetőségeit (példamolekulákkal szemléltetve) a 3. ábra mutatja be. A növényvilágban ezek közül leggyakrabban a 8-5' kötés alakul ki [7] (3. ábra).

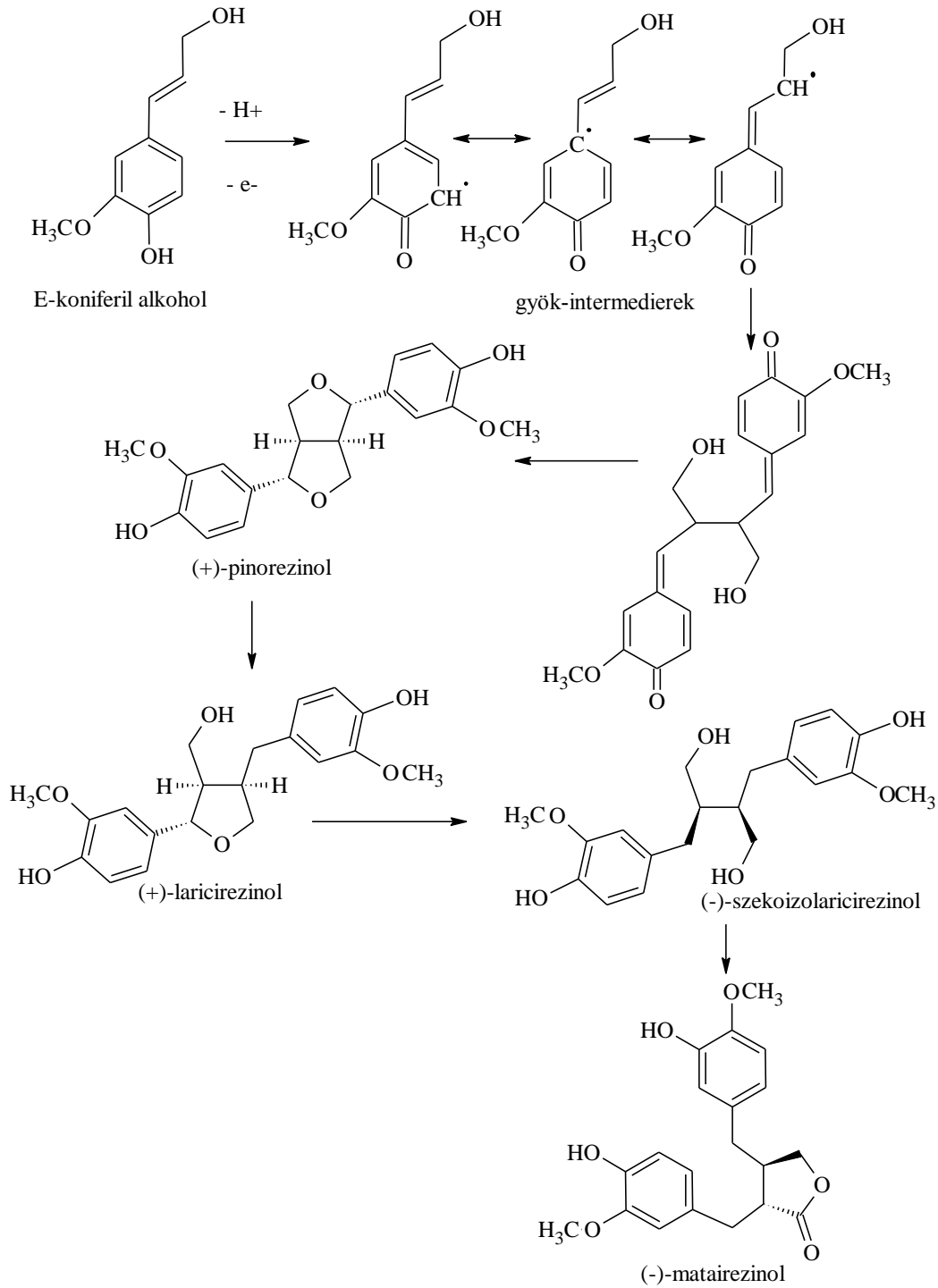


3. ábra. A neolignánok szerkezeti típusai példamolekulákkal bemutatva.

A Li-ok, NeLi-ok és SeNeLi-ok a növényekben szabadon (aglikon formában), vagy cukor molekulához kapcsolódva glikozidként is jelen lehetnek. A kapcsolódó cukormolekulák lehetnek monoszacharidok (5 C atomos apióz és ramnóz, vagy 6 C atomos glükóz [8,9]) vagy diszacharidok [2].

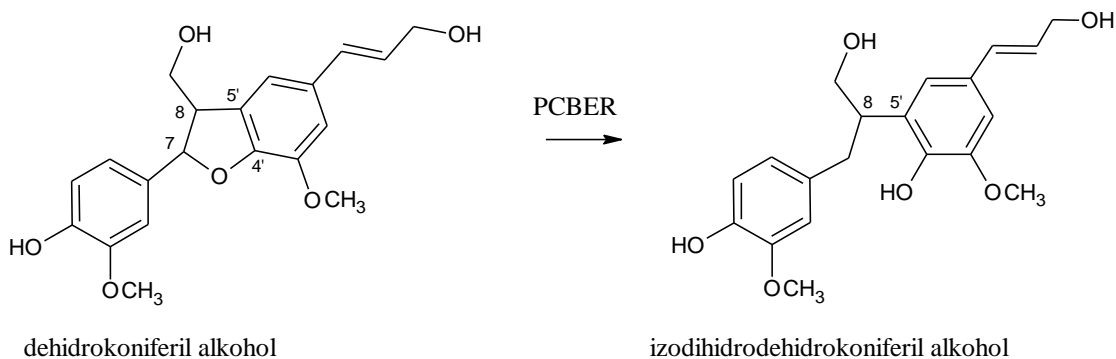
A Li, NeLi és SeNeLi szintézis kiindulási vegyülete a növényekben az E-koniferil alkohol (ezért ezt monolignolnak is nevezik). Két ilyen molekula gyökképződéssel egybekötött kapcsolódása pinorezinol kialakulásán keresztül vezet különféle Li-ok, pl. laricirezinol, szeikoizolaricirezinol, matairezinol képződéséhez (4. ábra). A

gyökképződéséhez oxidáló enzim (peroxidáz vagy lakkáz) szükséges, majd a két monolignol egység kapcsolódását ún. „vezető fehérjék” – dirigent proteinek (DP-ek) – katalizálják. A DP-eknek köszönhetően a dimerizációs reakció sztereospecifikus, ezért a végtermék tiszta enantiomer formájában keletkezik [10,11,12,13,6].



4. ábra. A lignánszintézis fontos lépései [1].

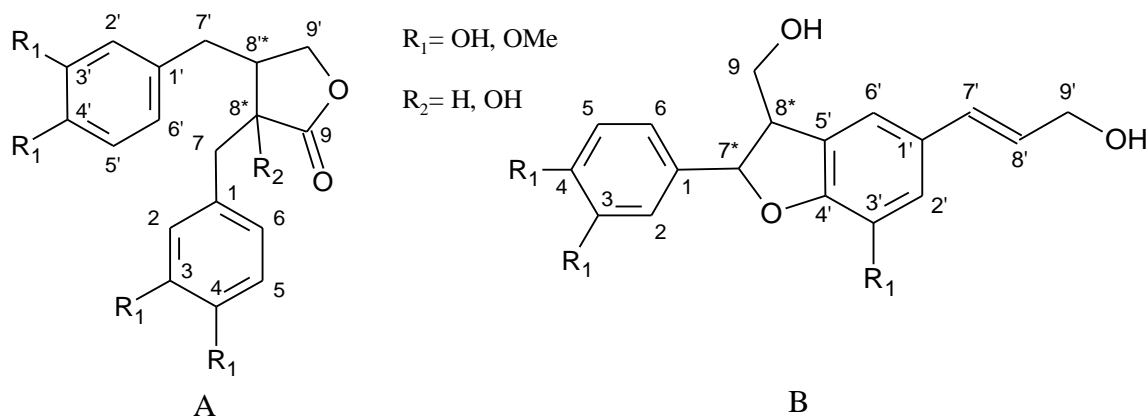
A 8-5' kapcsolódású neolignánok bioszintézise során a koniferil alkohol dimerizációja dehidrokoniferil alkoholt eredményez [14]. A fenilkumarán benzil éter redukáz enzim ezt képes átalakítani a 7-O-4' benzil-éter kötésnél (5. ábra).



5. ábra. A fenilkumarán benzil éter redukáz (PCBER) által katalizált lépés a neolignánok szintézise során [14].

2.2. Sztereoekémia

A Li, NeLi és SeNeLi molekulák királis szerkezetűek, a kiralitáscentrumok általában az alapegységek kapcsolódó C atomjai. Így a Li-ok DBBL csoportjában és gyakran a NeLi-ok között is két kiralitáscentrum található (6. ábra). A növényekben egy szerven belül viszont nem racémként, hanem tiszta enantiomerként fordulnak elő a bioszintézisüket katalizáló DP-ek működésének következményeként (2.1. fejezet) [10].



6. ábra. Királis C atomok (csillaggal jelölve) a lignánok dibenzilbutirolakton (A) és a neolignánok 8-5' kapcsolódási típusa (B) esetén (az R funkciós csoportok lehetnek különbözők).

Különböző növényfajokban, vagy akár ugyanannak a fajnak eltérő szerveiben előfordulhat, hogy egy Li molekulának nem azonos kiralitású izomerje képződik, azaz a különböző DP enzimek előfordulása lehet faj- vagy szervspecifikus. Így pl. az *Arctium lappa* (közönséges bojtorján) termésében (-), míg a levélkocsányban (+) forgatóképességű Li-ok találhatóak.

2.3. A lignánok hidrolízise

A glikozidok enzimatis hidrolízise. A növényekben a másodlagos anyagcseretermékek gyakran cukor molekulához kötve, inaktív glikozidként raktározódnak a sejtek vakuolumában. A glikozidokat felhalmozó növények a glikozidoktól elkülönítve tartalmazhatnak a glikozidok hidrolízisére alkalmas enzimeket is, melyek csak meghatározott esetekben kerülnek érintkezésbe a szubsztrátjukkal, pl. a sejtek kártevők általi roncsolódásakor. Az enzim-szubsztrát elkülönítettség megszűnésekor a sejtek víztartalmú közegében megtörténhet a glikozidok hidrolízise, mely a szabad aglikon képződését eredményezi. Gyakran a keletkező aglikon molekula aktív, a sejtkárosodást okozó kártevők elpusztítására képes, így védve a növényt [15]. Ilyen enzimatis folyamatot az általunk vizsgált összetevők esetében a *Cirsium arvense* – mezei aszat és a *C. oleraceum* – halvány aszat termésében figyeltek meg: előbbiben trahelozid, utóbbiban arctiin glikozidok enzimatis hasítása volt megfigyelhető a glikozid mennyiségének megfelelő aglikonok (trahelogenin és

arctigenin) képződése mellett. Az enzimátikus folyamat vizes közegben zajlik le és nagyon egyszerűen kivitelezhető: a porított száraz terméshez vizet adva 60 perc alatt teljes mértékű az átalakulás [16].

Savkezelés hatásai. A glikozidos kötés savas közegben hasítható az aglikon- és a cukorrészek képződése mellett [17].

2.4. A lignánok hatásai

Az általunk tanulmányozott összetevőket (Li, NeLi, SeNeLi) felhalmozó növények a népgyógyászatban is felhasználásra kerültek. A Li-ok csoportjába tartozó ariltetrahidronaftalin típusú podofillotoxin-származékokat tartalmazó *Anthriscus* és *Podophyllum* fajok, valamint a DBBL vázas Li tartalmú *Carthamus*, *Ferula*, *Piper*, *Trachelospermum*, *Wikstroemia* fajok felhasználásának évszázados hagyományai vannak (1. táblázat).

1. táblázat. A lignánok népgyógyászati felhasználása.

Lignán típusa	ariltetralin	faj, felhasznált rész	felhasználás	összetevő	irodalom
		<i>Anthriscus sylvestris</i> gyökér	daganatellenes	deoxipodofillotoxin	[18]
	<i>Podophyllum peltatum</i> gyökér	szemölcs, pszoriázis	podofillotoxin	[5]	
dibenzilbutirolakton	<i>Ferula sinkiangensis</i> gyökér	gyomorrontás, reuma	matairezinol, arctigenin	[19]	
	<i>Piper sp.</i> termés	gyulladáscsökkentő fájdalomcsillapító mikrobaellenes hasmenés asztma	kubebinon, yatein, tuhaplikatin trimetiléter, hinokinin, izoyatein, 5'- metoxihinokinin	[20,21]	
	<i>Carthamus tinctorius</i> mag	oszteoporózis koronaér betegség daganatellenes depresszió menstruációs problémák trombózis	arctigenin, trahelogenin, matairezinol	[22,23]	
	<i>Trachelospermum jasminoides</i> herba	reumás ízületi fájdalmak traumás sérülések	trahelogenin nortrahelogenin matairezinol	[24]	
	<i>Wikstroemia indica</i> gyökérgéreg	szifilisz arthritisz daganatellenes köhögéscsillapító	nortrahelogenin	[25]	

A tiszta formában kinyert összetevőkkel végzett hatástani vizsgálatok alátámasztják a népgyógyászati megfigyeléseket, valamint újabb, értékes hatásait is bizonyítják. Legfontosabbak az antioxidáns, gyulladáscsökkentő [5], láz- és fájdalomcsillapító, reumaellenes [18], féreg-, mikroba- és vírusellenes [18,5], immunszuppresszív, májvédő, csontritkulást megelőző, daganatellenes [5], neuroprotektív [26,27], fitoösztrogén, foszfodiészteráz-gátló, vérlemezke-aggregáció csökkentő és antitrombotikus [28] hatásai. A 2.4.1. és 2.4.2. fejezetben azoknak az

összetevőknek a gyógyászati jelentősége kerül bemutatásra, melyek az általunk vizsgált növényekben kimutatásra kerültek.

2.4.1. A dibenzilbutirolakton (DBBL) csoportba tartozó Li-ok hatásai

Daganatgátló hatás

Az általunk is azonosított DBBL Li-ok daganatgátló hatását a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat. A dibenzilbutirolakton lignánok daganatellenes hatásai.

	glikozid	daganatsejt típusa	hatás	irodalom
		arctiin	emlődaganat	kemopreventív
Dibenzilbutirolakton lignánok	trahelozid	AGS gyomor adenokarcinóma	apoptózis serkentése	[30,24]
		HepG2/NF- κ B hepatocelluláris karcinóma		
	arctigenin	A549 tüdő adenokarcinóma	mitokondriális légzés gátlása	[31]
			apoptózis serkentése, Akt-1 útvonal gátlása	[32]
		MDA-MB-231 humán emlődaganatos sejtvonala	ROS/p38 MAPK útvonal, Bcl-2 epigenetikai szabályozása	[33]
		SNU-1, AGS gyomorrákos sejtvonala	Bcl-2 és Bax aránya megváltozik	[34]
		CaCo2, CEM/ADR5000 (MDR sejtvonala)	P-gp gátlása	[35]
		SW480 humán vastagbél-daganatos sejtvonala	apoptózis serkentése, Wnt/ β -katenin jelátviteli út gátlása	[36]
		MH60 B limfocita hibridóma sejtvonala TF-1 mieloid eritroleukémia SP-2 murine mielóma	apoptózis serkentése	[37]
	trahelogenin	HepG2 hepatocelluláris karcinóma	NF- κ B jelátviteli út gátlása	[24]
AGS gyomor adenokarcinóma		apoptózis serkentése	[30]	
matairezinol	HepG2 hepatocelluláris karcinóma	NF- κ B jelátviteli út gátlása	[24]	

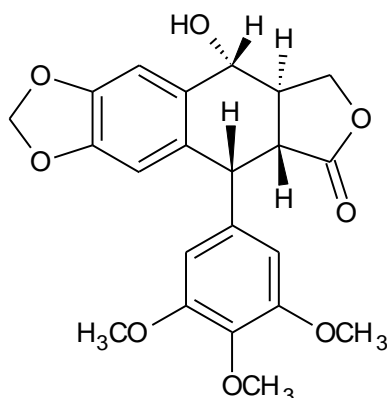
Ahol a glikozid és neki megfelelő aglikon daganatgátló tulajdonságát ugyanabban a rendszerben vizsgálták, azaz a glikozid és aglikon hatása összehasonlítható, ott megállapíthatjuk, hogy az aglikon a hatékonyabb [30,24]. A sejtosztódás gátlásában fontos szerepet kap a Wnt/ β -katenin jelátviteli út és az apoptotikus folyamatok befolyásolása (2. táblázat).

A Wnt/ β -katenin jelátviteli útvonal szerepe a daganatok kialakulásában

A Wnt/ β -katenin jelátviteli útvonal nagyon fontos szerepet játszik bizonyos daganattípusok (pl. vastagbélkarcinóma) kialakulásában [36]. A jelátviteli útvonal túlműködése azt eredményezi, hogy a β -katenin szintje a magban és a citoplazmában megemelkedik. A β -katenin egy transzkripciós koaktivátor a sejtmagban, ami a protoonkogénként ismert c-Myc transzkripciós faktor termelődését segíti elő. Ezek a fehérjék (β -katenin, c-Myc) a sejtciklusba léptetve a sejteket daganatos folyamatokat okozhatnak [38,39]. Működésük azonban foszforilációjukkal gátolható, amit a glikogén szintáz kináz 3 (GSK3) enzim végez [40]. Ezért a GSK3 enzim fontos daganatgátló fehérje, ugyanakkor ennek aktivitása is gátolható foszforilációval [41,42]. A doktori munkám keretében vizsgált összetevők közül a DBBL Li aglikon arctigenin hatását a Wnt/ β -katenin jelátviteli folyamatokra korábban már bizonyították: a β -katenin szint csökkentésével gátolja az SW480 vastagbeldaganatsejtek osztódását (2. táblázat).

A mikrotubuláris rendszer szerepe a daganatos folyamatokban

Az általunk azonosított összetevők közül az arcigenin esetén megállapították, hogy bizonyos daganattípusok esetében (pl. A549 [32], SW480 [36], AGS [30]) fokozza az apoptotikus folyamatokat és a többsejtmagvú óriássejtek keletkezését (2. táblázat). Ezek a folyamatok kapcsolatba hozhatók a mikrotubulus rendszer gátlásával: a kromoszómák utódsejtekbe húzásakor a mikrotubulusok nélkülözhetetlenek a szabályos sejtosztódás lezajlásához. A mikrotubuláris rendszer gátlásának következtében nem válik szét a kromoszómaállomány a sejtosztódás során, így ilyenkor abnormális magvú sejtek keletkezhetnek, melyek aztán apoptózissal lebontásra kerülnek és elpusztulnak [43]. A mikrotubulusok β -tubulin egységek összekapcsolódásával jönnek létre. A sejtek citoplazmájában polimerizált formában, működőképes állapotban lévő tubulusok és az őket felépítő β -tubulin egységek között dinamikus egyensúly áll fenn a β -tubulin képződéssel járó tubulus lebontás és felépítés folyamatainak párhuzamos lezajlása miatt [44]. A mikrotubuláris rendszer legismertebb gátlója a DBBL Li-ok (2. ábra, 5-ös váz) szerkezetével rokon felépítésű podofillotoxin [44] (7. ábra). Hatását kétféle mechanizmussal is kifejtheti: fokozhatja a tubulusok leépülését és gátolhatja a β -tubulin polimerizációt [44].



7. ábra. A podofillotoxin szerkezete.

Antivirális hatás

A DBBL-ok hatékonyak bizonyultak HIV [45], influenza [46] és herpesz vírusok [47] ellen. Az arctigenin és trahelogenin hatásmechanizmusát tanulmányozva megállapították, hogy az integráz enzimet gátolják [48,45]. A szerkezet-hatás összefüggés vizsgálata a lakton gyűrű és az orto-dihidroxifenil csoport jelenlétének szükségességét bizonyította a hatás eléréséhez [45].

Fitoösztrogén hatás

A fitoösztrogének olyan növényi anyagcseretermékek, melyek az emlős szervezetben ösztrogénszerű hatásokat fejtenek ki. Szerepet játszanak különféle hormondependens daganatok (emlő, prosztatata, vastagbél) visszaszorításában és megelőzésében, továbbá a csontritkulás kialakulását is gátolják [49]. A DBBL Li-ok közül a szekoizolaricirezinol, a matairezinol és a trahelogenin rendelkezik ilyen hatásokkal. Ezek egyrészt közvetlenül képesek kötődni az ösztrogén receptorokhoz, másrészt az emlős szervezetben keletkező metabolitjaik, az ún. emlős lignánok (enterolakton, enterodiol) képződése révén válnak hatékonyá [22,50].

Érrendszeri hatás

A lignánok kardiovaszkuláris hatásának hátterében a ciklikus adenozin monofoszfát (cAMP) foszfodiészteráz enzim gátlása áll, mely vazodilatációt eredményez. Emellett kalciumcsatorna-blokkoló, vérlemezke-aggregáció-gátló és

endotelin antagonist hatását is kimutatták, melyek vérnyomáscsökkentő hatást eredményeznek [2].

2.4.2. A NeLi és SeNeLi csoportba tartozó lignánok hatásai

NeLi és SeNeLi típusú anyagcseretermékeket eddig kevés növényfajban azonosították, és ezekben is csak kis mennyiségben fordulnak elő (2.5. fejezet, 3. táblázat). Valószínűleg ennek köszönhető, hogy jelentőségükről is csak kevés információ áll rendelkezésre. A SeNeLi típusú lappaol A és C daganatgátló hatását bizonyították prosztaták [51] és leukémia sejtek ellen [52] szabadgyökfogó tulajdonságuk mellett [53], míg az izolappaol A esetén csak leukémia sejtek elleni hatást mutattak ki [52]. Hasonló hatásokkal rendelkezik a NeLi balanofonin is, mely szabadgyökfogó [54], citotoxikus [55,56], melanogenezist gátló és antiproliferatív [57] tulajdonságú összetevő.

2.5. A Li, NeLi és SeNeLi típusú anyagcseretermékek előfordulása a növényvilágban

A Li csoportba tartozó DBBL típusú anyagcseretermékek a növényvilágban széleskörben elterjedtek [1,5]. Kiemelendő azonban a fészekvirágzatúak (Asteraceae) családjának bogáncs – *Cynareae (Carduae)* – nemzetségcsoportja, ahol a növények termései igen nagy mennyiségben tartalmazzák a DBBL Li-okat, jellemzően glikozid formában [58]. A DBBL glikozidok (arctiin, trahelozid és kartamozid) közül az arctiin és a trahelozid nagy mennyiségben fordul elő az *Arctium lappa* (arctiin, 78 mg/g [17]) és a *Cirsium arvense* (trahelozid, 14 mg/g [16]) termésein. A bogáncs nemzetségcsoportra (és a többi Asteraceae családba tartozó növényre is) jellemző terméstípus (melyben a DBBL Li-ok nagyobb mennyiségben vannak jelen) a kaszattermés. Ennek jellemzője, hogy a maghéjjal összenőtt termésfal kemény, elfásodott rétegén belül jól fejlett embrióval rendelkezik. Csírázáskor a megduzzadó embrió szétfeszíti és ledobja magáról a fásodott termésfal és magháj közös rétegét, lehetővé téve az elkülönült embrió és termésfal összetételének vizsgálatát. A termés említett két részének (embrió, illetve fal + magháj) elkülönítése a termés szétvágásával is megoldható, így a kettévágott termésemből az embrió eltávolítható. Az *Arctium lappa* és a *Cirsium arvense* termések elkülönített részeinek vizsgálata során megállapítást nyert,

hogy a DBBL glikozidok (arctiin és trahelozid) kizárólag a magállományában halmozódnak fel [58].

A NeLi balanofonin eddig csak 5 fajban került kimutatásra, és ezekben mérhető mennyisége rendkívül kevés: 0.00015 mg/g–0.027 mg/g közötti, a vizsgált fajoktól függően (3. táblázat).

Hasonlóan ritka és kis mennyiségű előfordulás jellemzi a SeNeLi-ok közül a lappaol A és C, az izolappaol A és C, valamint a pikrazmalignán molekulákat (3. táblázat).

3. táblázat. Szeszkvineolignánok és a neolignán balanofonin előfordulása és mennyisége a növényekben.

összetevők	faj, szerv	mennyiség (mg/g)	irodalom	
neolignán (NeLi) balanofonin	<i>Balanophora japonica</i> gyökér	-	[7]	
	<i>Chrysoaena verbascifolia</i> levél, virág	0,001	[59]	
	<i>Artemisia annua</i> tissue cultures	0,027	[60]	
	<i>Aquilaria sinensis</i> szár	0,00015	[56]	
	<i>Gmelina arborea</i> kéreg	0,0065	[54]	
	<i>Cornus kousa</i> termés	0,012	[61]	
	<i>Anastatica hierochuntica</i> teljes növény	0,0045	[57]	
szeszkvineolignán (SeNeLi)	lappaol C	<i>Arctium lappa</i>	1,22	[62]
			0,072	[63]
			0,010	[51]
			-	[64]
	izolappaol C	<i>Arctium lappa</i>	2,32	[62]
			0,0055	[63]
	izolappaol A	<i>Arctium lappa</i>	0,05	[52]
	lappaol A	<i>Arctium lappa</i>	0,075	[62]
			0,017	[52]
			0,0032	[51]
		<i>Centaurea americana</i> mag	0,091	[65]
		<i>C. macrocephala</i> mag	0,052	[53]
		<i>C. napifolia</i> herba	0,010	[66]
	<i>C. nicaensis</i> herba	0,0096	[67]	
	<i>C. sphaerocephala</i> herba	-	[68]	
	pikrazmalignán	<i>Picrasma quassioides</i> szár	$2,9 \times 10^{-5}$	[69]

2.6. A Cynareae – bogáncs nemzetségcsoport vizsgált fajai és ismert összetevőik

A *Cynareae* nemzetségcsoport általában szúrós, tövises szélű levelekkel és fészkepikkelyekkel rendelkező lágyszárú fajokat foglal magába. A gyomflóra több faja is idetartozik. A kaszatterméseiken megtalálható bóbíta a nemzetségek megkülönböztetésére is alkalmas. Az általunk vizsgált fajok közül Magyarországon vadon él a három aszat faj (*Cirsium eriophorum*, *C. brachycephalum* és *C. vulgare*: gyapjas, kiséfű és közönséges aszat) és a *Serratula tinctoria* – festő zsoldina, míg a

mediterrán *Cnicus benedictus* – benedekfű és az ázsiai *Leuzea carthamoides* termesztett gyógynövényként található meg nálunk.

A *Cirsium* fajokra jellemző a poliacetilének, flavonoidok és triterpének, köztük szteroidok előfordulása [70], emellett négy *Cirsium* faj (*C. arvense*, *C. canum*, *C. oleraceum* és *C. palustre*) termésének Li tartalmát is kimutatták korábban laboratóriumunkban [16]. A *Serratula tinctoria* közismert festő tulajdonsága flavonoidtartalmával magyarázható [71]. Li, NeLi és SeNeLi összetevőket a vizsgálatainkba bevonni tervezett *Cirsium* fajokban és a *Serratula tinctoria* növényben eddig nem mutattak ki.

A *Leuzea carthamoides* gyökereit ekdiszteroid tartalmuk miatt adaptogén droggént használják, a mentális és fizikai teljesítőképesség növelésére egyaránt alkalmas [72]. Kaszatterméseiben alkaloidok (feruloil-szerotonin izomerek) mellett DBBL típusú Li összetevőket is azonosítottak [72,73]: a karamozid – kartamogenin és a trahelozid – trahelogenin glikozid – aglikon molekulapárokat mutatták ki mennyiségi adatok közlése nélkül.

A *Cnicus benedictus* hajtása keserűanyag tartalma miatt étvágy- és emésztést serkentő, májvédő hatású. Kaszattermése jelentős mennyiségben tanninokat, illóolajat, gyantát is tartalmaz [74]. Emellett a termésekben a Li-ok DBBL csoportjából az arctiin glikozid került kimutatásra [75]. Az arctiin mennyisége a termésben nem ismert.

3. Célkitűzések

Célul tűztük ki (1-6. pontokban felsorolva):

(1.) a Li-ok és rokon vegyületeik (NeLi-ok, SeNeLi-ok) vizsgálatát a *Cynareae* nemzetségcsoport néhány fájában. Ilyen típusú vegyületek a tanulmányozásra szánt fajok között kettőben (*Cnicus benedictus*, *Leuzea carthamoides*) már azonosításra kerültek, de mennyiségük meghatározatlan maradt, míg másik négy faj (*Cirsium brachycephalum*, *C. eriophorum*, *C. vulgare* és *Serratula tinctoria*) esetében nem álltak rendelkezésre adatok ezekről az összetevőkről. Ennek megfelelően az összetevők azonosítása és mennyiségi meghatározása minden esetben célunk volt.

Az általunk – minőségi és mennyiségi szempontból egyaránt – meghatározott összetevők

(2.) speciális átalakulási reakcióinak (enzimatis hidrolízis és savkatalizált ciklizáció) valamint

(3.) termésrész-specifikus felhalmozódásának megismerése után

(4.) tiszta formában történő izolálásukhoz optimális módszerek kidolgozását terveztük.

(5.) A rendelkezésre álló izolált tiszta vegyületek részletes szerkezetbizonyításán túl

(6.) daganatgátló hatásaikat és az ebben szerepet játszó mechanizmusok feltárását is célul tűztük ki.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Növényminták

A *Cnicus benedictus* és a *Leuzea carthamoides* termések a Gyógynövénykutató Intézet Kft-ből (Budakalász, Lupaszigeti út 4) származtak, a *Cirsium brachycephalum*, *C. eriophorum* és *C. vulgare*, valamint a *Serratula tinctoria* termések pedig a növények természetes élőhelyein, érett állapotban kerültek begyűjtésre:

Cirsium brachycephalum: Lajosmizse környéke, 2013. június;

Cirsium eriophorum: Mátra, 2013. szeptember;

Cirsium vulgare: Budapest, Népsziget, 2010. augusztus;

Serratula tinctoria: Somogy megye, 2012. szeptember.

4.2. Reagensek, oldószerek

A HPLC elválasztásokhoz gradiens tisztaságú acetonitril (ACN), a többi feladathoz analitikai tisztaságú vegyszerek kerültek felhasználásra: ecetsav, metanol, piridin (Reanal, Magyarország), deuterált kloroform (CDCl_3), metanol- d_4 , dimetil szulfoxid- d_6 , (DMSO- d_6), tetrametil szilán (TeMS, Sigma Aldrich, USA), trifluorecetsav (TFES), hexametildiszilazán (HMDS), hidroxilamin-hidroklorid (Serva, Németország).

Lignán standardok: arctigenin, matairezinol, podofillotoxin (Sigma Aldrich, USA), arctiin (BioSolutions Halle GmbH, Németország) voltak.

4.3. Kromatográfiai módszerek

4.3.1. HPLC-UV MS/MS és TOF MS vizsgálatok

A vizsgálatok Agilent 1260 Infinity HPLC készülék (G1312B pumpa, G1367E automata mintaadagolóval, G1315C diódasoros detektorral) felhasználásával történtek. Oszlop: Grace Smart RP-C18 (5 μm), 150 mm \times 4.6 mm (Grace Davison Discovery Sciences Lokeren, Belgium). Oldószerek: A eluens = ACN:0.07 M ecetsav, 15:85 (V/V); B eluens ACN:0.07 M ecetsav, 85:15 (V/V). Grádiens program: 0 perc: 15% B; 5 perc: 30% B, 12 perc: 44% B. Áramlási sebesség: 1.0 mL/perc, detektálás: 200-600 nm tartományban (mennyiségi értékelés 280 nm vagy 347 nm), injektált térfogat: 10 μL , oszlophőmérséklet és autosampler hőmérséklete: 25°C.

A tandem tömegspektrometriás vizsgálatok (MS/MS) JetStream Elektrospray (ESI) ionforrással felszerelt Agilent 6460 tripla kvadrupol tömegspektrométerrel történtek. A pontos tömeg adatokhoz JetStream Elektrospray ionforrással felszerelt Agilent 6230 time-of-flight (TOF) MS készülék felhasználásával jutottunk. Az MS/MS és TOF MS paraméterek a [76] közleményben leírtakkal azonosak voltak.

Preparatív elválasztáshoz az analitikai méréshez használt műszert használtuk preparatív oszloppal: Nucleosil 100, C18 (10 μm), 150 \times 10 mm (Teknokroma, Sant Cugat del Vallès, Spanyolország). A gradiens program az analitikai elválasztással azonos volt, az áramlási sebesség 3,0 mL/perc, a detektálás 280 nm hullámhosszon történt, az injektált térfogat 200-300 μL volt.

4.3.2. Gázkromatográfia-tömegspektrometria (GC-MS)

Készülék: Saturn II GC-MS, Varian (Walnut Creek, CA, USA), ioncsapda detektorral (ITD), Varian 8200 automata mintaadagolóval. Az oszlop típusa: SGE BPX5 (30 m, 0,25 mm; 0,25 μm filmvastagság) kapilláris oszlop (SGE Incorporated, Austin, TX, USA).

Származékkészítés: a vizsgálandó növényi kivonatok megszáritott részleteit 250 μL hidroxilamin hidroklorid/piridin oldatban (2,5 g hidroxilamin hidroklorid/100 mL piridin) melegítettük 70°C hőmérsékleten 30 percig, majd 450 μL HMDS és 50 μL TFES hozzáadása után 100°C-on 60 percig melegítettük. Az elkészült oldatokat HMDS hozzáadásával hígítottuk, injektált térfogat: 1 μL .

Injektor program: az injektálást 150°C-on végeztük, 2 percig tartottuk ezen a hőmérsékleten, majd 330°C-ra melegítettük 1 perc alatt, és így tartottuk 5 percig. Gradiens program: 150°C (4,5 perc), 330°C-ra fűtés (22,5 perc), 330°C (7 perc, teljes elúciós idő: 34 perc). MS körülmények: 70 eV; transfer line hőmérséklete: 280°C, mainfold: 80°C. Multiplier offset: 250 eV. A belső tandem duplikáció paraméterei automata módban voltak beállítva.

4.4. NMR spektroszkópia

Az NMR spektrumok felvétele CDCl_3 , metanol- d_4 vagy DMSO- d_6 oldószerekben történt, kettős 5 mm-es IDPFG próbaféjjel felszerelt Varian VNMRs spektrométeren (599.9 MHz ^1H és 150.9 MHz a ^{13}C NMR esetén).

Az 1D (^1H NMR, ^{13}C NMR, NOE) és a 2D (COSY, TOCSY, [^1H - ^{13}C] HSQC és [^1H - ^{13}C] HMBC) spektrumokhoz a standard pulzusszekvenciákat és standard paramétereket használtuk. A kémiai eltolódások számításához CDCl_3 oldószerben történő méréseknél tetrametil szilán (TeMS) belső standardot használtunk (*Cnicus benedictus*), míg DMSO- d_6 -ban (*Cirsium brachycephalum*, *C. vulgare*, *Serratula tinctoria*) és metanol- d_4 -ben (*Cirsium eriophorum*) mérve az oldószer eltolódásaihoz viszonyítottuk a kémiai eltolódásokat (DMSO: $\delta_{\text{H}} = 2.50$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 39.5$ ppm, metanol- d_4 : $\delta_{\text{H}} = 3.31$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 49.15$ ppm).

4.5. Kvantitatív meghatározás

A mennyiségi meghatározáshoz az izolált aglikon összetevők különböző koncentrációjú oldatainak HPLC-UV vizsgálata alapján készült hárompontos, külső standard kalibrációs egyeneseket használtuk [UV abszorpciós maximumuknál detektálva: a DBBL Li-okat (arctigenin, kartamogenin, matairezinol, trahelogenin) és lappaol-szerkezetűeket (lappaol C, izolappaol C, lappaol A, izolappaol A) 280 nm hullámhosszon, míg a NeLi-okat (balanofonin, prebalanofonin) és a SeNeLi szerkezetű pikrazmalignánt és prepikrazmalignánt 347 nm hullámhosszon]. Az aglikonoknak megfelelő glikozidok mennyiségét az aglikon kalibráció alapján számítottuk [17]. A kalibrációs oldatok összetevőinek koncentrációtartománya a terméskivonatokban lévő megfelelő összetevők koncentrációját magában foglalta és a számított determinációs együtthatók (r^2) értéke minden esetben legalább 0,9997 (prepikrazmalignán és balanofonin) volt.

4.6. Abszolút konfiguráció meghatározása geometriai és termokémiai számítással

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektrumokat metanolban vettük fel, Jasco J720 spektropolariméteren (Jasco INC., Tokyo, Japán). Háromszor vettük fel a spektrumokat, 1 nm sávszélességgel és 0,2 nm-es lépésekkel, 50 nm/perces sebességgel.

Az abszolút konfiguráció meghatározása a lehetséges különböző izomerek számításával előállított CD spektrumainak a ténylegesen mért CD spektrummal való összehasonlítása alapján, elméleti számolással történt. A geometriai és termokémiai számítások M06-2X/6-31G(d)/IEF-PCM(metanol), az ECD számítások M06-2X/6-311+G(2d,p)/IEF-PCM(metanol) szinten történtek. A spektrumokat Gauss görbék

illesztésével szimuláltuk SpecDis program segítségével. A kvantumkémiai számításokat Gaussian 09 programcsomaggal végezték.

4.7. A termés részeinek szétválasztása csíráztatással

A terméseket csírázásuk előidézéséhez nedves szűrőpapírra tettük, majd a gyökér megjelenéséig sötétben, szobahőmérsékleten tartottuk. A csírázott termés embrió része szétfeszíti a kemény, fás terméscfal rétegét az általunk vizsgálni kívánt két termésrész (terméscfal és embrió) szétválását eredményezve.

4.8. Enzimes hidrolízis

Az érett, egész terméseket és az elkülönített termésrészeket (terméscfal és embrió) liofilizáltuk majd elporítottuk. A por 0,02–0,5 g (analitikai pontossággal mérve) részletét 1,0–5,0 mL desztillált vízben szuszpendáltuk. A szuszpenziót 40°C-on tartottuk különböző időtartamokra (5–120 perc), majd a mintákat rotációs vákuumbepárlóval (35–40°C-on) szárazra pároltuk.

4.9. Kivonatok készítése

A megszáritott (liofilizálással) és elporított érett, egész termések és az elkülönített termésrészek, valamint az enzimmel hidrolizált minták 0,02–1,0 g (analitikai pontossággal mérve) részletéhez 2,0–5,0 mL térfogatú, 80% (V/V) koncentrációjú metanol oldatot mértünk majd 60°C hőfokon tartottuk (30, vagy 60 percig). A kivonatkészítés idejének leteltével a szuszpenziókat centrifugáltuk. A felülúszót eltettük, és a leülepedett termésszövetet az előzőekkel megegyező módon még kétszer extraháltuk. A három felülúszót egyesítettük, és ennek a térfogatát 10,0 vagy 15,0 mL-re egészítettük ki 80% (V/V) metanol hozzáadásával.

4.10. Savkezelés

A kivonatok törzsoldatából (4.9. fejezet) 0,250–1,00 mL térfogatú részleteket rotációs vákuumbepárlóval (35–40°C-on) megszáritottuk. A száritott kivonatrészletekhez és izolált összetevőkhöz (lappaol C és izolappaol C) 500 µL térfogatú TFES oldatot (2M) mértünk és az oldatokat különböző időtartamokig (5–120 perc) 50°C vagy 100°C hőmérsékleten tartottuk. Ezután a savas oldatokat rotációs vákuumbepárlóval (35–40°C-on) megszáritottuk, majd 80% (V/V) oldatban feloldottuk.

4.11. SW480 vastagbél-daganatsejtekre kifejtett hatások vizsgálata

A kísérleteket SW480 vastagbél-daganatsejteken (ATCC – American Type Culture Collection – kód: CCL-228) végeztük, melyeket 37°C-on, 5% CO₂-os atmoszférában, Roswell Park Memorial Institute tápközegben (RPMI-1640) tartottuk.

A sejteket

- 1.) a sejtosztódás gátlás (antiproliferatív hatás) vizsgálatára (szulforhodamin-B – SRB módszerrel, 4.11.1. fejezet) 96 lyukú tenyésztő lemezekre (3000 sejt/lyuk);
- 2.) a mikrotubulus gátlás mikroszkópos (immuncitokémiai módszerrel, 4.11.2. fejezet) vizsgálatára tárgylemezre (3×10^4 sejt/lemez);
- 3.) az apoptotikus folyamatok és a sokmagvú óriássejtek képződésének FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) módszerrel (4.11.3. fejezet) való vizsgálatához tenyésztőedényekbe (10^5 sejt/edény);
- 4.) a Wnt/ β -katenin jelátviteli útban szereplő fehérjék (β -katenin, foszfo- β -katenin, c-Myc, foszfo-c-Myc, GSK3, foszfo-GSK3 α , foszfo-GSK3 β) és a β -tubulin befolyásolásának Western-blot módszerrel (4.11.4. fejezet) történő vizsgálatához tenyésztőedényekbe (10^5 sejt/edény) tettük.

A sejtek áttételét követő 48 órás inkubációs idő letelte után a sejtek tápközegét hatóanyag tartalmú (izolált lignánok, standard lignánok és podofillotoxin) tápközegre cseréltük (a kezeletlen kontroll sejteket pedig normál, lignánt nem tartalmazó tápközegre). A kezelési idő letelte után a 4.11.1–4.11.4. fejezetekben bemutatott vizsgálatokat végeztük (csak a lényeges lépéseket emeltük ki, részletes leírás a [S3] és [S5] közleményekben található).

4.11.1. Sejtosztódás gátlás vizsgálata szulforodamin-B (SRB) módszerrel

A kezelési idő leteltével SRB oldatot mértünk a lyukakba. A sejtek által meg nem kötött SRB kimosása után a megkötött festék (SRB) sejtszámmal arányos mennyiségét Multiscan MS ELISA plate olvasó segítségével (A. A. Lab Systems, Ramat-Gan, Israel) 570 nm hullámhosszon mért abszorbancia értékével jellemeztük. A sejtosztódás gátlást százalékban fejeztük ki $100 - 100 \times A/B$ képlet alkalmazásával, ahol A a hatóanyaggal kezelt, B pedig a kontroll kezeletlen minták abszorbanciája.

4.11.2. Mikrotubulusok vizualizációja immuncitokémiával

A kezelési idő leteltével a sejteket anti- β -tubulin hozzáadása után másodlagos antitestekkel (anti-rabbit; AlexaFluor 488) inkubáltuk majd fluoreszcens mikroszkóp (Nikon Eclipse E600) segítségével végeztük a kiértékelést.

4.11.3. Az apoptotikus folyamatok és sokmagvú óriássejtek képződésének FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) módszerrel történő vizsgálata

A kezelési idő leteltével a sejteket centrifugáltuk és Becton-Dickinson FACSCalibur műszerrel vizsgáltuk.

4.11.4. A Wnt/ β -katenin jelátviteli útban szereplő fehérjék, valamint a β -tubulin Western-blot módszerrel történő meghatározása

A kezelési idő leteltével a sejteket lízis pufferben lizáltuk és szonikáltuk. Centrifugálás után a felülúszó fehérjéit elektroforézissel szétválasztottuk poliakrilamid gélen. A fehérjéket membránra blotolásukat követően elsődleges antitestekkel (4. táblázat) kezeltük. A nem kötődött antitestek kimosása után torna peroxidázhoz (HRP) kötött másodlagos antitestekkel kezeltük a membránokat. Végül a HRP oxidáló képességén alapuló kemolumineszcencia detektálása Kodak Image Station 4000 MM készülék segítségével történt.

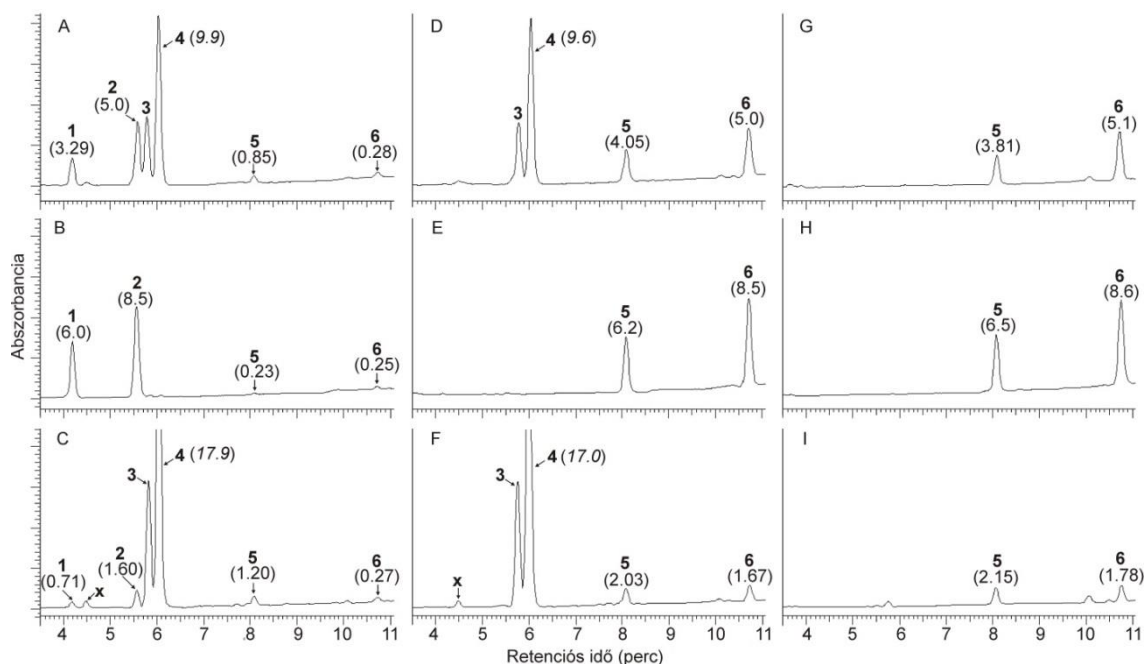
4. táblázat. Western-blothoz használt elsődleges antitestek.

Ellenanyag neve	Alkalmazott hígítás	Eredet	Gyártó	Katalógus szám
anti β -katenin	1:3000	Nyúl	Atlas	HPA029159
anti foszfo- β -katenin	1:500	Nyúl	Cell Signaling	9561S
anti GSK3 β	1:2000	Nyúl	Cell Signaling	9325S
anti foszfo-GSK3 α/β	1:500	Nyúl	Cell Signaling	9331
anti foszfo-c-myc	1:500	Nyúl	Thermo Scientific	PA1-14268
anti- β -tubulin	1:2000	Egér	Sigma	T8328

5. Eredmények

5.1. A *Leuzea carthamoides* termésének összetétele

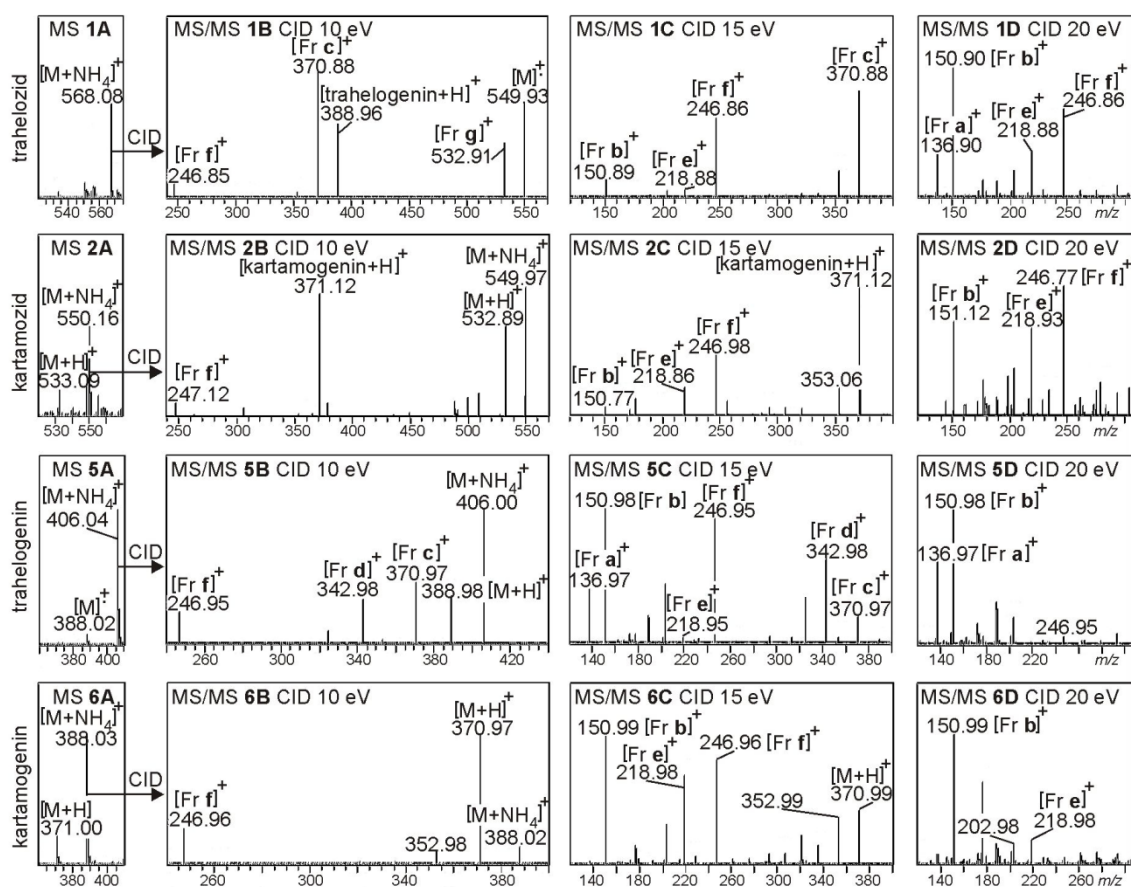
A *Leuzea carthamoides* egész terméséből készült kivonatban hat összetevő volt elkülöníthető HPLC-UV módszerrel (8.A ábra).



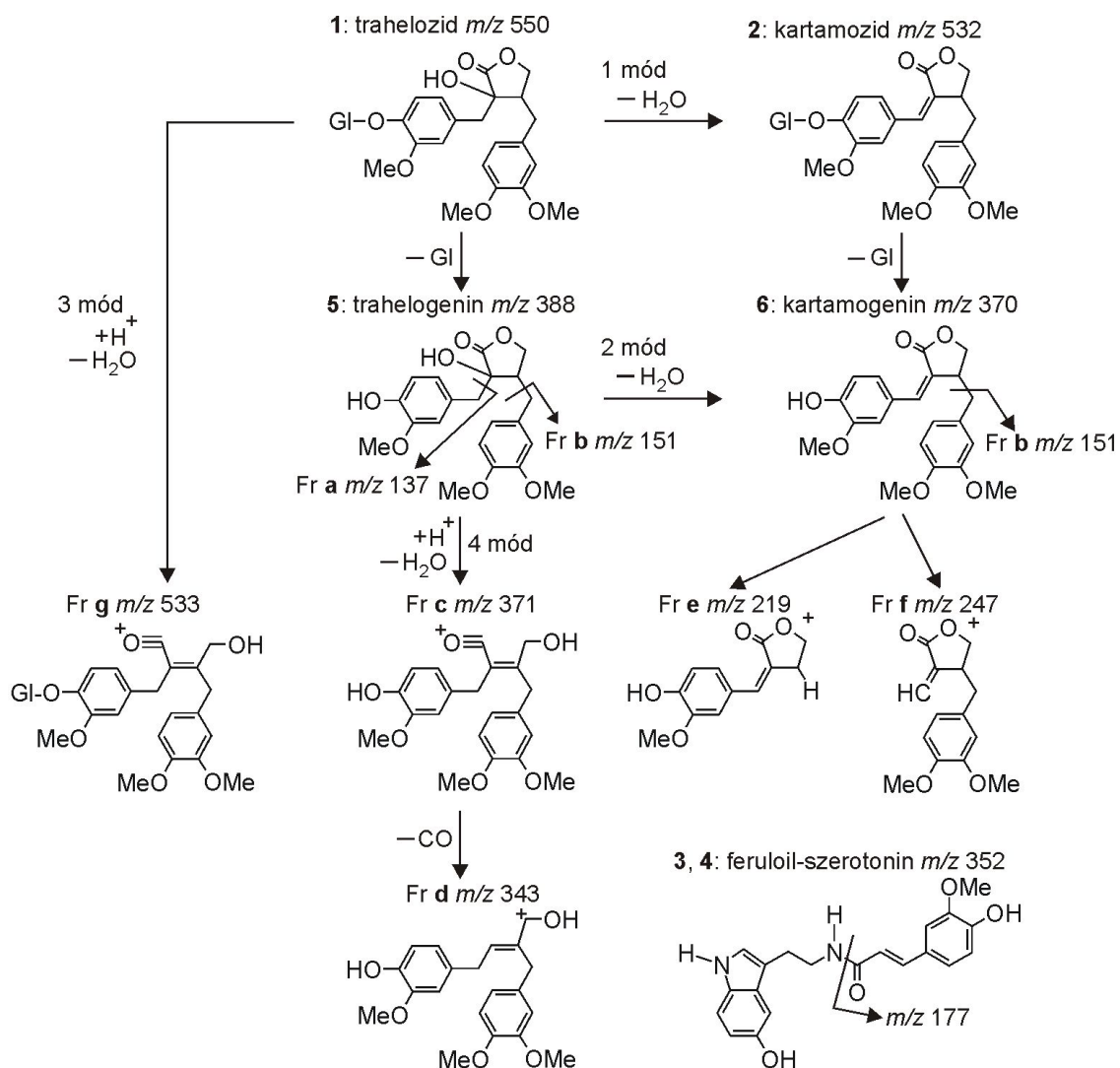
8. ábra. Hidrolizálatlan termésminták (A: egész termés, B: embrió, C: termésfal), ezek enzimmel (D, E, F), vagy savval (G, H, I) hidrolizált megfelelőinek HPLC-UV ($\lambda=280$ nm) kromatogramjai. Összetevők: 1, trahelozid; 2, kartamozid; 3 és 4 feruloil-serotonin izomerek; 5, trahelogenin; 6, kartamogenin; x, ismeretlen szennyező. A zárójelben lévő adatok az egyes összetevők mennyiségeit (álló adatok), és a feruloil-serotonin izomerek összes mennyiségét jelentik (*dőlt adatok*), mmol/100g értékben kifejezve. Az adatok három párhuzamos mérés átlagából lettek kiszámítva. A párhuzamos mérések relatív standard deviáció értékei (RSD) 2,0 RSD% (trahelozid a B mintában) és 3,8 RSD% (kartamozid a C mintában) között változtak.

Azonosításuk HPLC-MS/MS és GC-MS módszerrel történt. A HPLC-MS spektrumokon az összetevők ammónium kationokkal képzett molekulaionjait azonosítottuk (9. ábra). Ezek ütközés-indukált disszociáció (CID) folyamatai bizonyítják a molekulák szerkezetét (9. és 10. ábra). A folyamatok érdekessége, hogy a trahelozid és trahelogenin kétféle módon lezajló vízvesztéssel is stabilizálódhat (10. ábra): a trahelozid 1- és 3-módon, a trahelogenin pedig 2- és 4-módon. A trahelozid 1-

és a trahelogenin 2-úton lezajló átalakulása mindkettőjük spektrumában a kartamogénre jellemző ionok (m/z 219 és 247) megjelenését is eredményezi.

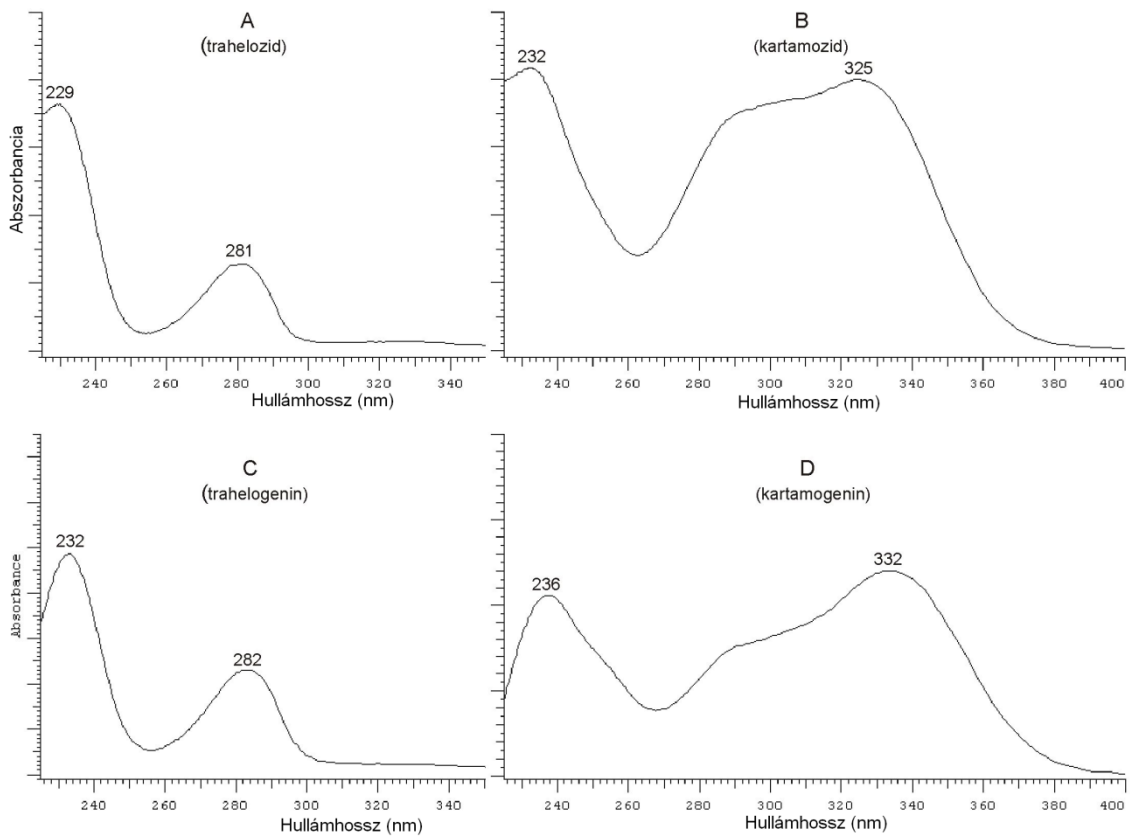


9. ábra. A trahelozid (1A – 1D), kartamozid (2A – 2D), trahelogenin (5A – 5D) és kartamogén (6A – 6D) LC-ESI-MS/MS spektrumai. Az 1A – 6A spektrumok (első oszlopban) az ESI-MS spektrumok, míg az 1B – 6D spektrumok (második, harmadik és negyedik oszlopokban) az ESI-MS/MS spektrumoknak felelnek meg, melyek három különböző energiával [10, 15 és 20 elektron volt (eV)] kiváltott ütközés-indukált disszociáció (CID) eredményei. Az Fr a – Fr g jelű fragmentum ionok szerkezete a 10. ábrán látható.



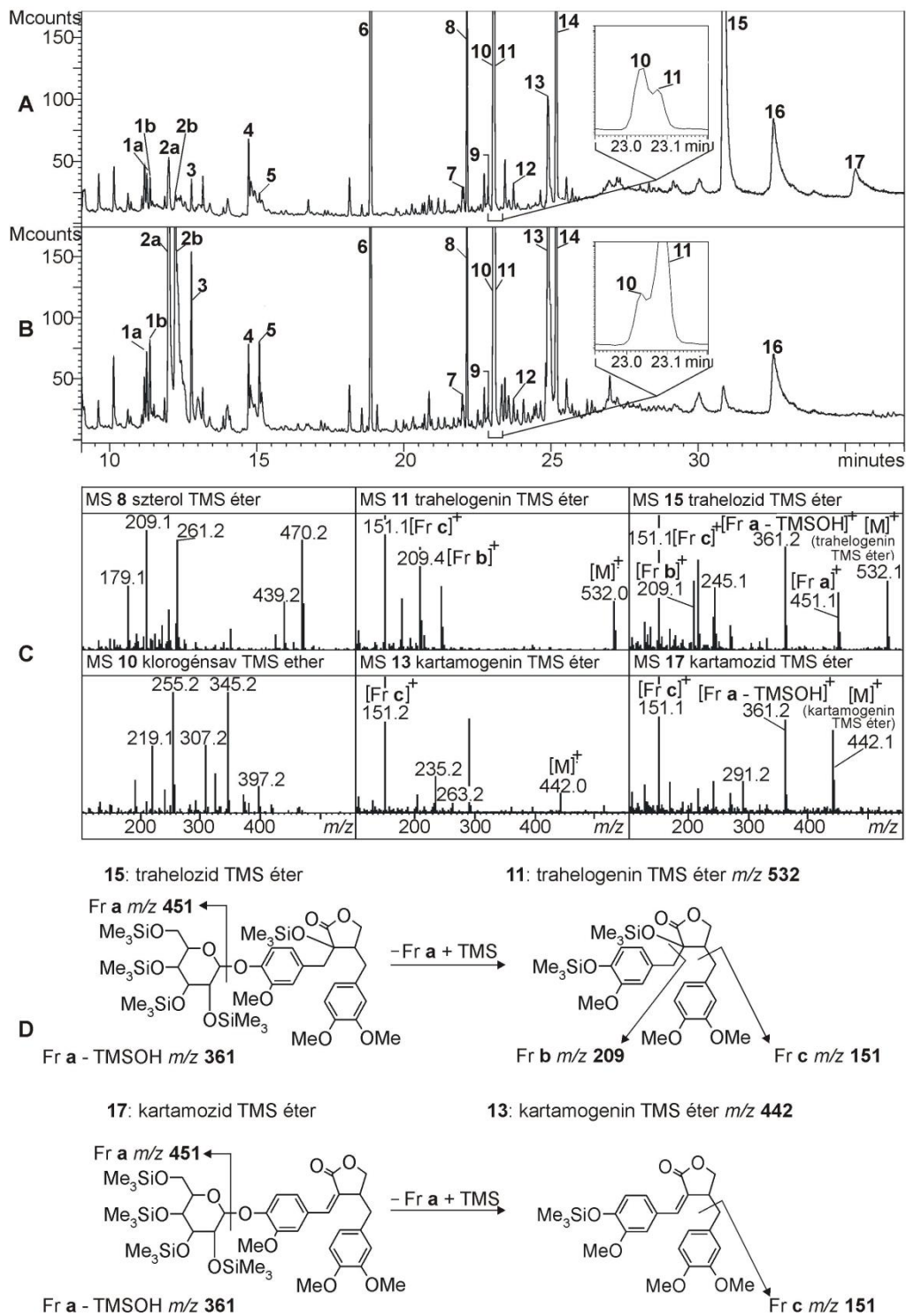
10. ábra. A dibenzilbutyrolakton lignánok és a feruloil-szerotonin fragmentációs folyamatai. A fragmentum ionok (Fr a – Fr g) megfelelő tömegspektrumai az 9. ábrán találhatóak.

A trahelozid/trahelogenin UV spektrumait ($\lambda_{\max}=281/282$ nm hullámhosszokon) összehasonlítva a kartamozid/kartamogenin spektrumaival megállapítható, hogy a kartamozid/kartamogenin batokróm eltolódású ($\lambda_{\max}=325$ nm és 332 nm), ami a kiterjedtebb konjugált elektronrendszerével magyarázható (11. ábra).



11. ábra. UV spektrumok (A-D), melyek a dibenzilbutirolakton lignán glikozidokhoz [trahelozid (A), kartamozid (B)] és azok aglikonjaihoz [trahelogenin (C), kartamogenin (D)] tartoznak.

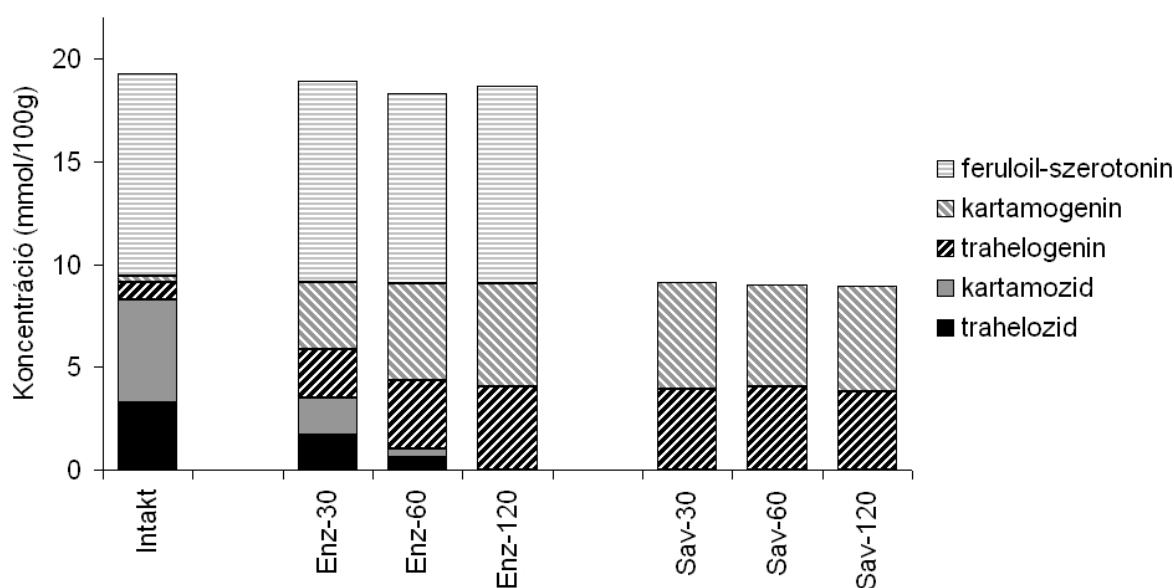
A természetes összetevőinek azonosítása trimetilszilil (TMS)-származékaik formájában GC-MS segítségével is megtörtént tovább bizonyítva a HPLC-UV-MS módszerrel azonosított DBBL Li-ok szerkezetét. Emellett a TMS-származékok vizsgálata az eddig csak a növény gyökerében azonosított cukrok, klorogénsav izomerek és szterán vázas vegyületek termékekbeni jelenlétét bizonyították (12. ábra).



12. ábra. A hidrolizálatlan (A) és az enzimmel hidrolizált (B) teljes termés kivonatának GC-MS kromatogramjai kiegészítve a jellemző összetevők MS spektrumaival (C) és azok fragmentációs folyamataival (D). Összetevők: **1a, 1b**, fruktóz; **2a, 2b**, glükóz; **3**, inozit; **4**, linolsav; **5**, sztearin sav; **6**, szaharóz; **7, 9, 10** és **12** klorogénsav izomerek; **8**, szterán vázas vegyületek; **11**, trahelogenin; **13**, kartamogenin; **14, 16**, triszaharidok; **15**, trahelozid; **17**, kartamozid.

A savval és enzimmel végzett hidrolízis hatása a termék összetételére

Mindkét módszer a DBBL Li glikozidok teljes mennyiségének elbomlását, és a nekik megfelelő aglikonok képződését eredményezte. A glikozidok aglikonná alakulásának időigénye azonban különböző volt a két módszer esetén: savkezeléssel 30 perc alatt teljes volt az átalakulás, míg ehhez enzimmel 120 percre volt szükség. Jelentős különbség mutatkozik a két módszer szelektivitásában: a savkezeléssel a feruloil-szerotonin izomerek ismeretlen bomlástermékekké alakultak, míg az enzimes folyamat csak a DBBL Li glikozidok átalakulását eredményezte (13. ábra).



13. ábra. A dibenzilbutirolakton lignánok és feruloil-szerotonin mennyisége a hidrolizálatlan (Intakt) és a 30, 60 vagy 120 percig enzimmel (Enz-30, Enz-60, Enz-120) vagy savval 100°C hőmérsékleten (Sav-30, Sav-60, Sav-120) hidrolizált termékben. Az adatok három párhuzamos mérés átlagából lettek kiszámítva. A párhuzamos mérések relatív standard deviáció (RSD) értékei 2,1 RSD% (trahelogenin a Sav-60 mintában) és 5,3 RSD% (kartamozid az Enz-30 mintában) között változtak.

A termés elkülönített fal és embrió részének összetétele

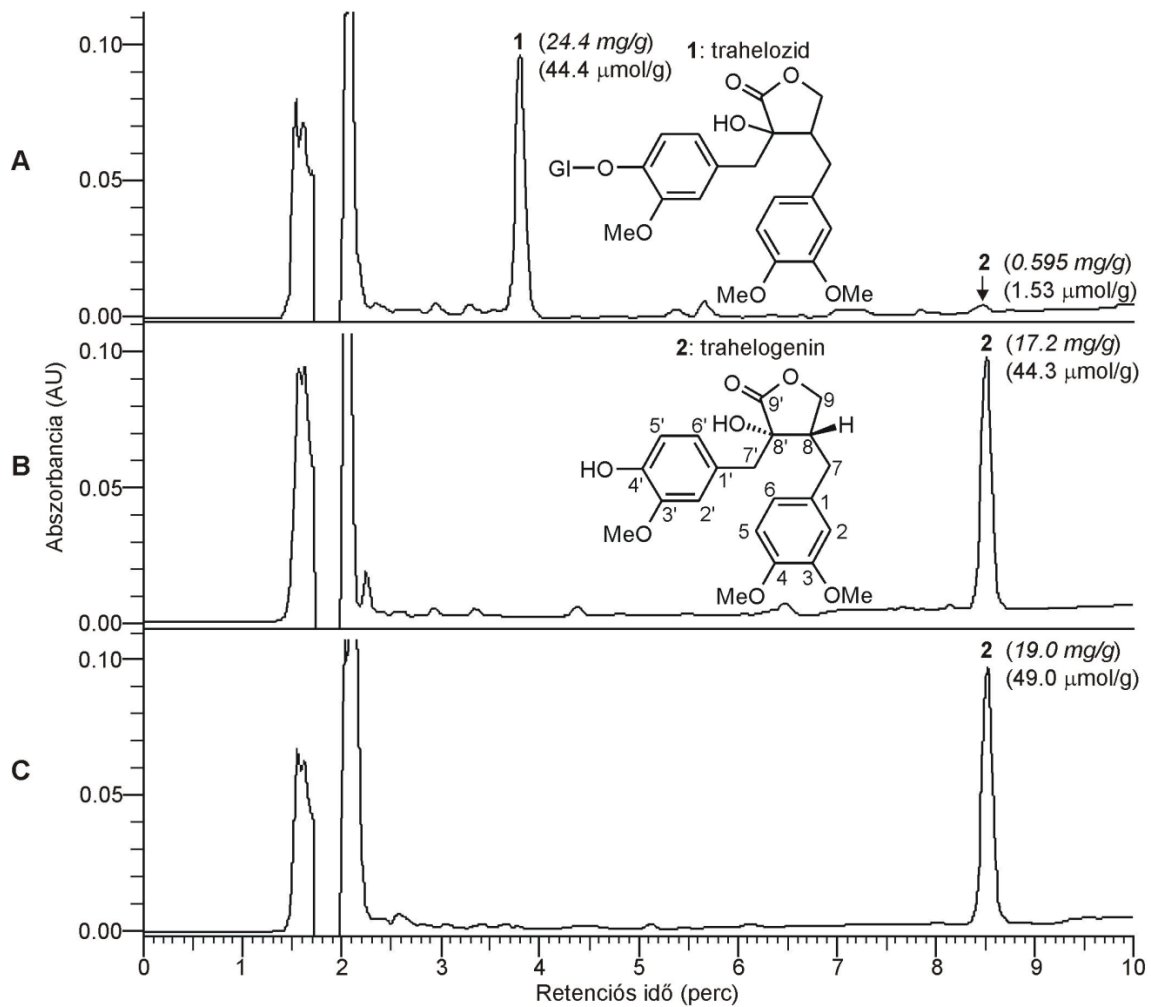
Összehasonlítva a DBBL Li-ok és az alkaloid feruloil-serotonin izomerek mennyiségét a termés elkülönített embrió és fal részében (8.A, 8.B és 8.C ábrák) megállapítható, hogy a glikozid trahelozid és kartamozid felhalmozódási helye a termés embrió része, míg az alkaloidok kizárólag a termésfalban találhatók meg. A különböző típusú összetevők ilyen elkülönülése megkönnyíti izolálásukat: az alkaloidokat (8.C ábra, 3. és 4. csúcs) a termésfalból, az Li glikozidokat pedig (8.B ábra, 1. és 2. csúcs) az embrióból izolálva nem szennyezik egymást.

Az enzimmel vagy savval hidrolizált embrió minták pedig egyaránt alkalmasak a trahelogenin és kartamogenin kinyerésére, az enzimes folyamat egyszerű kivitelezhetősége miatt azonban jobb választás. Így a két aglikon izolálásához az optimális nyersanyag az enzimhidrolizált embrió.

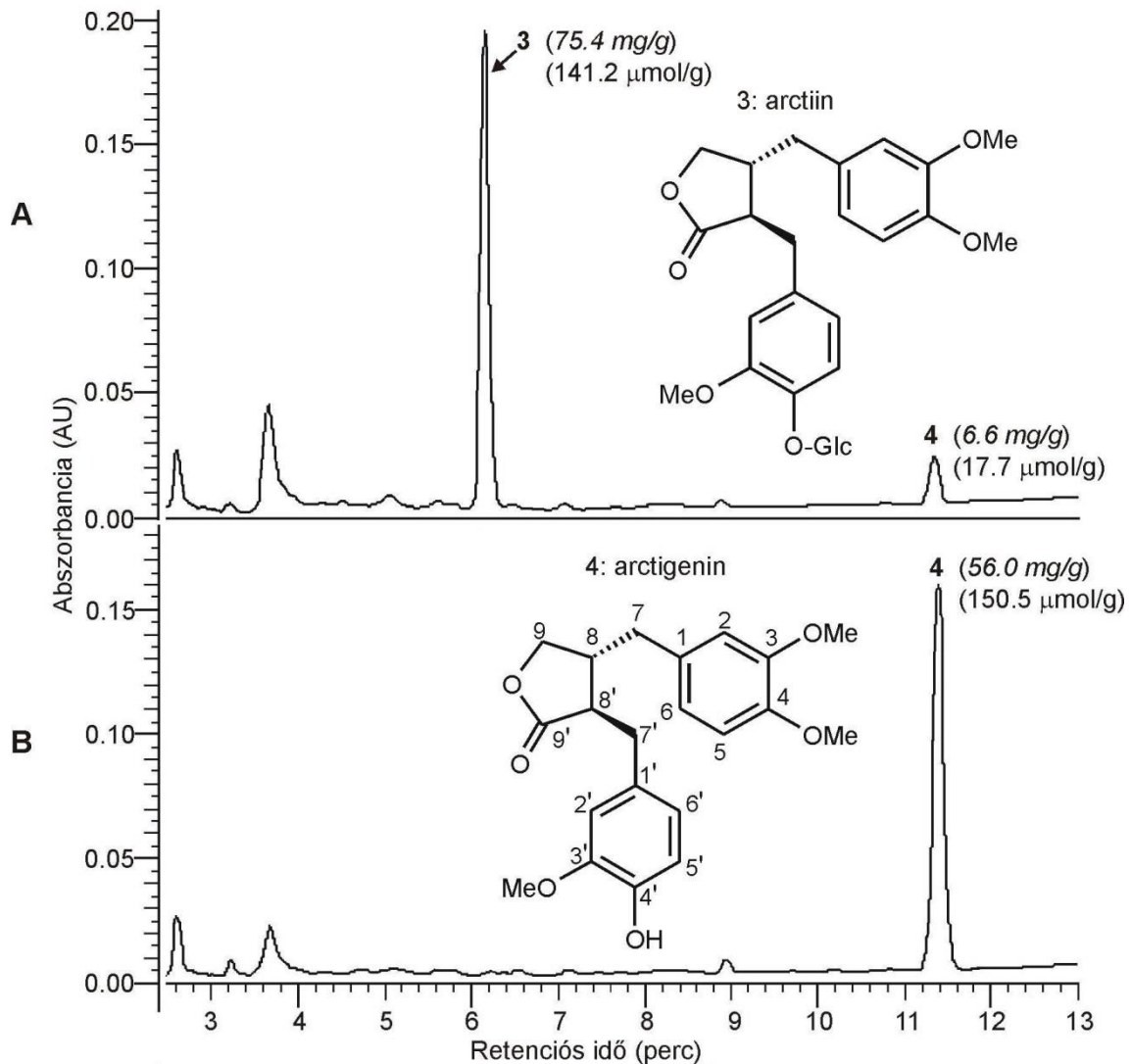
Az enzimmel hidrolizált embrió nagy kartamogenin és trahelogenin tartalma lehetővé tette a két Li aglikon nagyobb mennyiségben (5–10 mg között) történő izolálását a daganatgátló hatásaik vizsgálata céljából (5.6.1. fejezet).

5.2. A *Cirsium brachycephalum* – kifestő aszat és a *Serratula tinctoria* – festő zsoldina termékek vizsgálata

A két faj termésösszetételének meghatározásához hidrolizálatlan, továbbá enzimmel és savval hidrolizált mintáikat tanulmányoztuk. A háromfajta kivonatot összehasonlítva hasonló átalakulás figyelhető meg a két faj esetén. Az intakt hidrolizálatlan kivonatokban lévő összetevők (14.A ábra, 1 komponens; 15.A ábra, 3 komponens) enzim- és savkezelés hatására egyaránt átalakultak: az 1 mennyiségének megfelelő 2 és a 3 mennyiségének megfelelő 4 mérhető a *C. brachycephalum* és *S. tinctoria* enzimmel (14.B és 15.B ábra), valamint a *C. brachycephalum* savval hidrolizált (14.C ábra) kivonataiban (a *S. tinctoria* savval hidrolizált mintája nem kerül bemutatásra). Az átalakulások mennyiségi viszonyainak követéséhez az összetevők mennyiségét $\mu\text{mol/g}$ mértékegységben is kifejeztük (15. és 16. ábra, zárójelben lévő álló adatok).



14. ábra. A *Cirsium brachycephalum* hidrolizátlan intakt (A), enzimhidrolizált (B) és savval hidrolizált (C) terméskivonatainak HPLC-UV kromatogramjai az összetevők mennyiségének [zárójelben lévő adatok mg/g (*döntött*) és μmol/g (*álló*) mértékegységekben megadva] feltüntetésével. Összetevők: 1 trachelozid, 2 trachelogenin.



15. ábra. A *Serratula tinctoria* hidrolizátlan intakt (A) és enzimhidrolizált (B) terméskivonatainak HPLC-UV kromatogramjai az összetevők mennyiségének [zárójelben lévő adatok mg/g (döntött) és $\mu\text{mol/g}$ (álló) mértékegységekben megadva] feltüntetésével. Összetevők: 3 arctiin, 4 arctigenin.

Ezek a specifikus átalakulási folyamatok, továbbá a komponensek HPLC-TOF MS (5. táblázat) adatai a trahelozid-trahelogenin és arctiin-arctigenin glikozid-aglikon párok jelenlétét bizonyítják a *C. brachycephalum* és *S. tinctoria* terméseiben.

5. táblázat. A *Cirsium brachycephalum* és a *Serratula tinctoria* természetesítőinek HPLC-TOF MS (ESI, pozitív és negatív ion módban) adatai.

Összetevő		Összegéplet	Ionizáció módja	Detektált ion	Számolt m/z	Mért m/z	diff (ppm)
Név							
1	Trahelozid	$C_{27}H_{34}O_{12}$	pozitív	$[M+Na]^+$	573.1942	573.1951	-1.55
			negatív	$[M-H]$	549.1978	549.1985	-1.23
2	Trahelogenin	$C_{21}H_{24}O_7$	pozitív	$[M+Na]^+$	411.1414	411.1423	-2.25
			negatív	$[M-H]$	387.1449	387.1457	-1.98
3	Arctiin	$C_{27}H_{34}O_{11}$	pozitív	$[M+Na]^+$	557.1993	557.2000	-1.14
			negatív	$[M-H]$	533.2028	533.2023	1.00
4	Arctigenin	$C_{21}H_{24}O_6$	pozitív	$[M+Na]^+$	395.1465	395.1456	2.02
			negatív	$[M-H]$	371.1500	371.1501	-0.32

Az izolált trahelogenin és arctigenin NMR adatai (6. táblázat) és az irodalmi adatokkal [73,77] egyező negatív optikai forgatóképesség értékeik (trahelogenin: $[\alpha]_D^{25}$ -31,2; arctigenin: $[\alpha]_D^{25}$ -28,5) bizonyítják a 14. és 15. ábrákon látható szerkezeteiket.

6. táblázat. A *Cirsium brachycephalum* és *Serratula tinctoria* terméséből izolált arctigenin és trahelogenin ^1H és ^{13}C NMR adatai DMSO- d_6 oldószerben mérve.

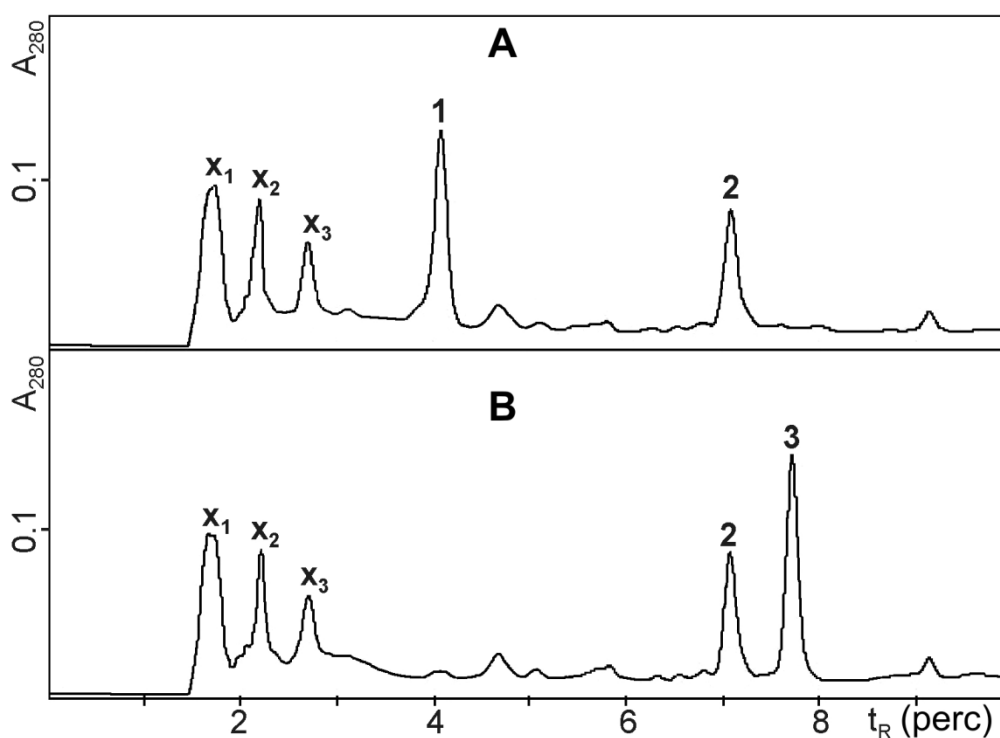
Atom*	δ ^1H (J_{HH} , Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H (J_{HH} , Hz)	δ ^{13}C
	arctigenin		trahelogenin	
1	-	129.3	-	131.7
2	6.63 d (1.9)	113.5	6.68 d (1.7)	112.4
3	-	147.7	-	148.7
4	-	147.8	-	147.2
5	6.67 d (8.0)	116.2	6.83 d (8.2)	111.8
6	6.57 dd (8.0, 1.9)	122.5	6.64 dd (8.2, 1.7)	120.4
7	2.45 dd 2.48 dd	37.9	2.62 dd (13.5, 4.1) 2.42 dd (13.5, 10.1)	30.8
8	2.45 m	41.2	2.35 m	42.8
9	3.87 dd (8.8, 7.3) 4.06 dd (8.8, 8.6)	71.3	3.94 d (8.3)	70.0
1'	-	131.6	-	126.4
2'	6.73 d (1.8)	114.5	6.74 d (1.8)	114.4
3'	-	149.1	-	147.2
4'	-	145.5	-	145.4
5'	6.82 d (8.1)	112.9	6.67 d (8.0)	115.2
6'	6.58 dd (8.1, 1.8)	122.6	6.58 dd (8.0, 1.8)	122.6
7'	2.72 dd 2.81 dd	34.3	2.98 d (13.6) 2.83 d (13.6)	40.2
8'	2.69	46.0	-	75.4
9'	-	178.4	-	178.0
3-OMe	3.71 s	55.7	3.71 s	55.3
4-OMe	3.71 s	55.9	3.70 s	55.5
3'-OMe	3.69 s	55.9	3.69 s	55.5
4'-OH	8.80 s	-	8.85 br s	-
8'-OH	-	-	6.22 br s	-

*A C atomok számozása azonos a 14. és 15. ábrákon lévő trahelogenin és arctigenin szerkezeti képletén lévő számozással.

5.3. A *Cirsium vulgare* – közönséges aszat termésének összetétele

A *C. vulgare* termésösszetételének vizsgálatakor először a kezeletlen egész termésekből és azok enzimhidrolizált mintáiból készítettünk kivonatokat. A két kivonat (hidrolizálatlan intakt és enzimmel hidrolizált) HPLC-UV kromatogramjait összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy

- 1.) az 1 összetevő elbomlásával párhuzamosan a 3 jelent meg, míg
- 2.) a 2 összetevőre nincs hatással az enzimés kezelés (16. ábra).

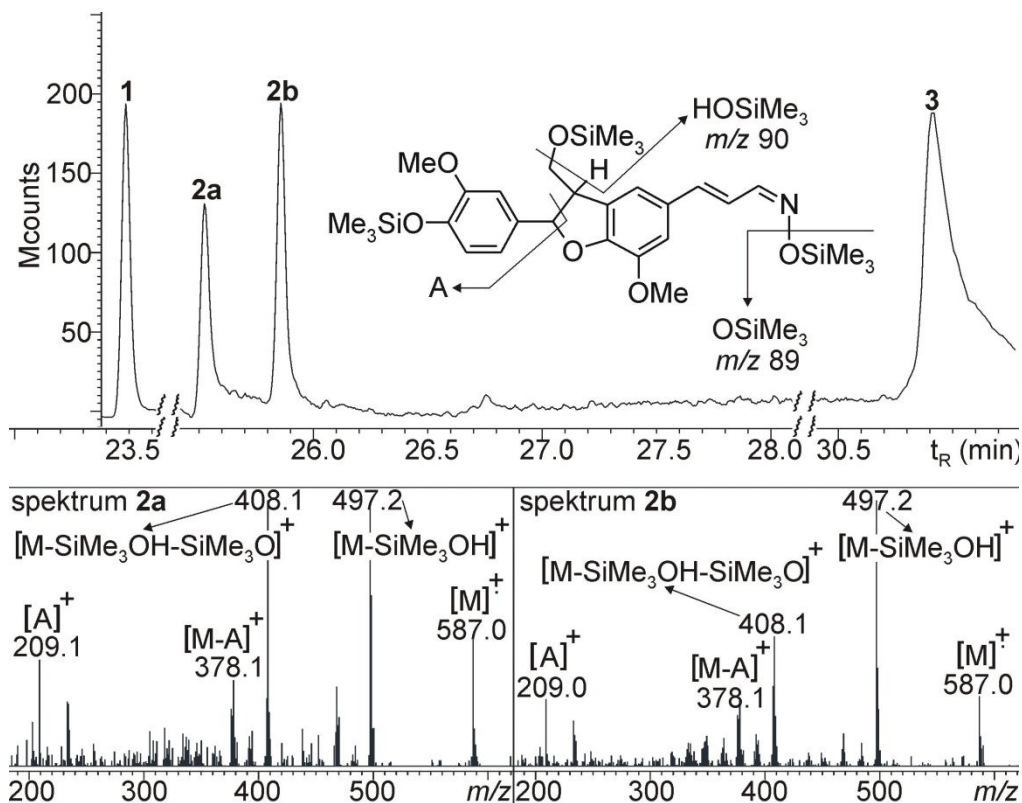


16. ábra. A *Cirsium vulgare* hidrolizálatlan intakt (A) és enzimhidrolizált (B) termékivonatainak HPLC-UV kromatogramjai. Összetevők: 1 trahelozid, 2 balanofonin, 3 trahelogenin, x_1 , x_2 és x_3 : ismeretlen szennyezők.

Ebből kiindulva feltételezhető, hogy az 1/3 összetevők glikozid/aglikon viszonyban lehetnek, míg a 2 valószínűleg aglikon típusú vegyület, amit a glikozidhoz viszonyított későbbi retenciós ideje is alátámaszt: a glikozidok cukorrészük miatt polárisabbak, mint a nekik megfelelő aglikonok. Emellett a 2 UV spektrumának abszorpciós maximuma ($\lambda_{\max}=347$ nm) a korábban azonosított DBBL Li típusú vegyületekhez képest (trahelozid/trahelogenin: 281/282 nm; kartamozid/kartamogenin:

325/332 nm, 11. ábra) batokróom eltolódást mutat, ami a DBBL Li típusú vegyületeknél kiterjedtebb konjugált elektronrendszer jelenlétét feltételezi.

Az 1/3 összetevők HPLC-TOF MS adatai továbbá TMS származékaik GC-MS eredményei (17. ábra) alapján a glikozid trahelozid (1) és az aglikon trahelogenin (3) voltak [a HPLC-TOF MS eredmények megegyeznek a *C. brachycephalum*-ban azonosított trahelozid és trahelogenin adataival (6. táblázat)], így ezek itt nem kerülnek bemutatásra].



17. ábra. A *C. vulgare* természetesösszetevők [trahelogenin (1), balanofonin (2a, 2b) és trahelozid (3)] trimetilszilil (oxim) éter származékainak GC-MS kromatogramja és a balanofonin származékok MS spektrumai a fragmentációs folyamatok feltüntetésével. A balanofonin E és Z oxim izomer származékokat képez: 2a (E oxim) és 2b (Z oxim).

A 2 összetevő számított molekulatömege (egy protonnal képzett molekulaion m/z 357 LC-MS eredményéből) M_w 356. Ugyanakkor TMS származékai m/z 587 molekulaionnal jellemezhetők. A TMS származék tömege (m/z 587) és a molekulatömeg (M_w 356) közötti különbség 231. Az általunk alkalmazott származékkészítési folyamat során két hidroxil csoport trimetilszilileződése és egy keto csoport oximálódása és trimetilszilileződése eredményezhet 231 egységnyi

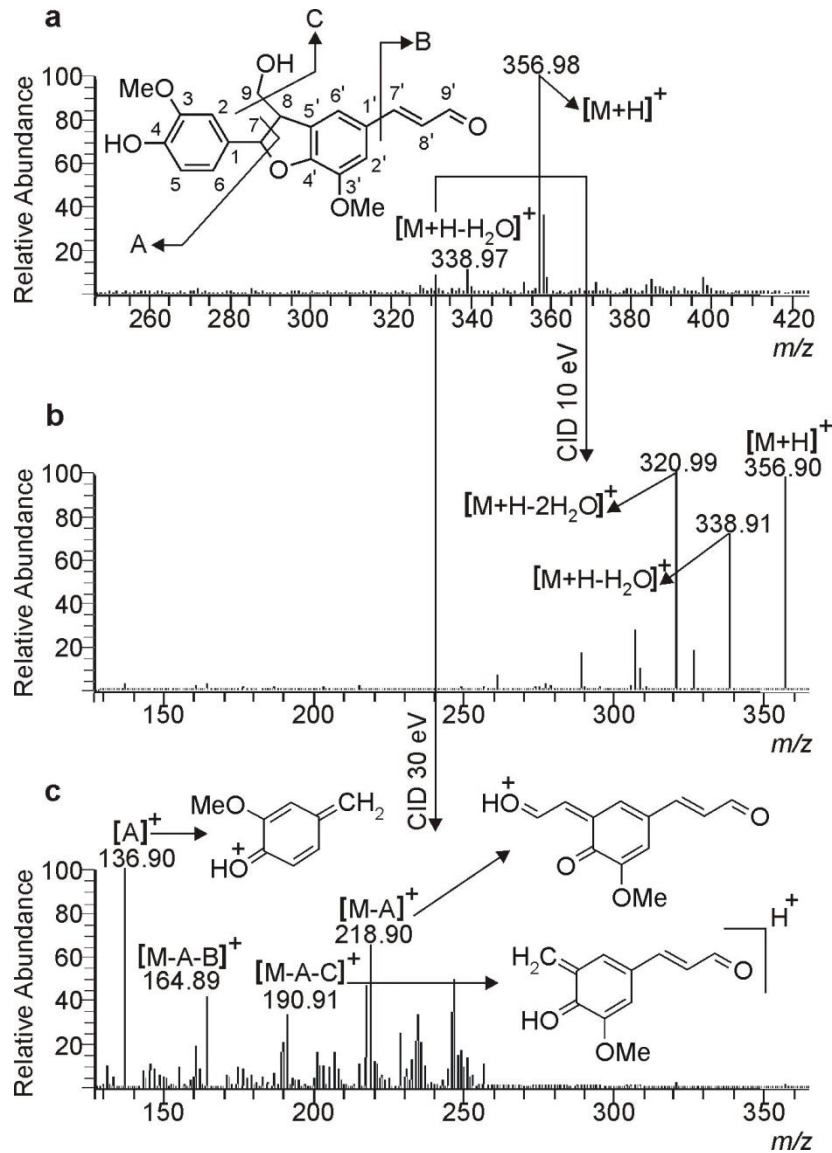
tömegnövekedést (egy –OH és egy =O ilyen származékai 72 és 87 tömegnövekedéssel járnak, azaz $2 \times 72 + 87 = 231$).

A 2 összetevő összegképlete a HPLC-TOF MS adatai (pozitív és negatív ionizációs módban: m/z $[M+H]^+ = 357.1334$ és m/z $[M-H]^- = 355.1187$) alapján: $C_{20}H_{20}O_6$.

A ChemSpider adatbázis tanulmányozása során megállapítottuk, hogy a balanofonin rendelkezik két –OH és egy =O csoporttal azok között a molekulák között, melyek $C_{20}H_{20}O_6$ összegképlettel jellemezhetők.

A 2 összetevő (balanofonin):

- 1.) protonnal képzett molekulaionjának különböző ütközési energián (10 eV és 30 eV) lezajló specifikus fragmentációs folyamatai HPLC-MS/MS módszerrel vizsgálva (18. ábra), továbbá
- 2.) TMS oxim éter származékának GC-MS módszerrel azonosított fragmentum ionjai egyaránt a balanofonin szerkezetét támasztották alá (17. ábra).



18. ábra. A balanofonin HPLC-MS spektruma (a) és protonnal képzett molekulaionjának HPLC-MS/MS spektruma 10 eV és 30 eV energiákkal kiváltott ütközés-indukált disszociáció (CID) eredményeképpen (b és c).

A balanofonin szerkezetét NMR vizsgálataink egyértelműen bizonyították (7. táblázat).

7. táblázat. A *Cirsium vulgare* termésből izolált balanofonin ^1H és ^{13}C NMR valamint HMBC adatai, DMSO- d_6 oldatban felvéve.

Atom*	δ ^1H (J_{HH} , Hz)	δ ^{13}C	HMBC
1	-	131.67	
2	6.92 <i>s</i>	110.44	146.62; 118.69; 88.13
3	-	147.59	
4	-	146.62	
5	6.77 <i>átfedő</i>	115.36	131.67; 88.13
6	6.77 <i>átfedő</i>	118.69	
7	5.56 <i>d</i> (6.7)	88.13	150.70; 131.67; 118.69; 110.44; 62.64; 52.40
8	3.52 <i>m</i>	52.40	150.70; 131.67; 130.15; 118.95; 88.13; 62.64
9	3.68 és 3.72 <i>m</i>	62.64	88.13
1'	-	127.68	
2'	7.31 <i>s</i>	112.54	154.01; 150.70; 118.95; 144.09
3'	-	144.09	
4'	-	150.70	
5'	-	130.15	
6'	7.31 <i>s</i>	118.95	154.01; 150.70; 112.54; 52.40
7'	7.65 <i>d</i> (15.7)	154.01	194.02; 118.95; 112.54
8'	6.77 <i>dd</i> (15.7; 7.8) részben <i>átfedő</i>	126.10	127.68
9'	9.60 <i>d</i> (7.8)	194.02	126.10
3-OMe	3.74	55.63	147.59
3'-OMe	3.84	55.84	144.09
4-OH	9.11 <i>br s</i>	-	
9-OH	5.08 <i>br s</i>	-	

*A C atomok számozása azonos a 18. ábrán lévő balanofonin szerkezeti képletének számozásával.

A terméscsész és embrió összetétele

A csészázás során szétvált terméscsész és embrió (19. ábra) összetételét vizsgáltuk hidrolizálatlan intakt állapotukban és enzimatis hidrolízist követően (8. táblázat).



19. ábra. A *Cirsium vulgare* egész termése, (A) amely csírázott állapotban (B) terméscfal (C) és embrió (D) részekre különül.

8. táblázat. A *Cirsium vulgare* egész termésének és a termés csírázás során elkülönült embrió és terméscfal részeinek összetétele hidrolizálatlanul (Intakt) és enzim-hidrolízisüket (EnzHidr) követően.

összetevők	Összetevők mennyisége*					
	teljes termés		terméscfal		embrió	
	Intakt	EnzHidr	Intakt	EnzHidr	Intakt	EnzHidr
balanofonin	13.0 (4.4)	14.1 (4.9)	23.2 (3.9)	24.9 (3.1)	-	-
trahelozid	8.7 1.52 (3.9)	-	-	-	20.3 3.40 (4.5)	-
trahelogenin	-	5.7 1.47 (3.0)	-	-	-	12.6 3.25 (5.2)

*a glikozid/aglikon trahelozid/trahelogenin átalakulás követése érdekében mennyiségüket mmol/100g-ban is megadtuk (dőntve írt adatok) a mg/g értékek mellett (álló adatok). Az eredmények három mérés átlagát jelentik (zárójelben: a három mérés eltérésére számított RSD% értékek).

A különböző típusú összetevők elkülönülten fordulnak elő: a balanofonin a terméscfal összetevője, míg a DBBL Li trahelozid glikozid az embrióban halmozódik fel, ahol enzimátikus kezelést követően teljes egészében hidrolizál trahelogenin képződése mellett. Az eredmények birtokában azt a következtetést vonhatjuk le, hogy

- 1.) balanofonin nagyobb mennyiségben (trahelozid/trahelogenin szennyezés nélkül) a terméscfalból,
- 2.) trahelozid az intakt embrióból (balanofonin szennyezés nélkül), és
- 3.) trahelogenin pedig az ezimhidrolizált embrióból nyerhető ki.

5.4. A *Cirsium eriophorum* - gyapjas aszat termésének összetétele

A *C. eriophorum* – gyapjas aszat termései a csírázás során (hasonlóan mint azt a *C. vulgare* terméséinél is megfigyeltük) embrió és terméscfal részre különíthetők (20. ábra).

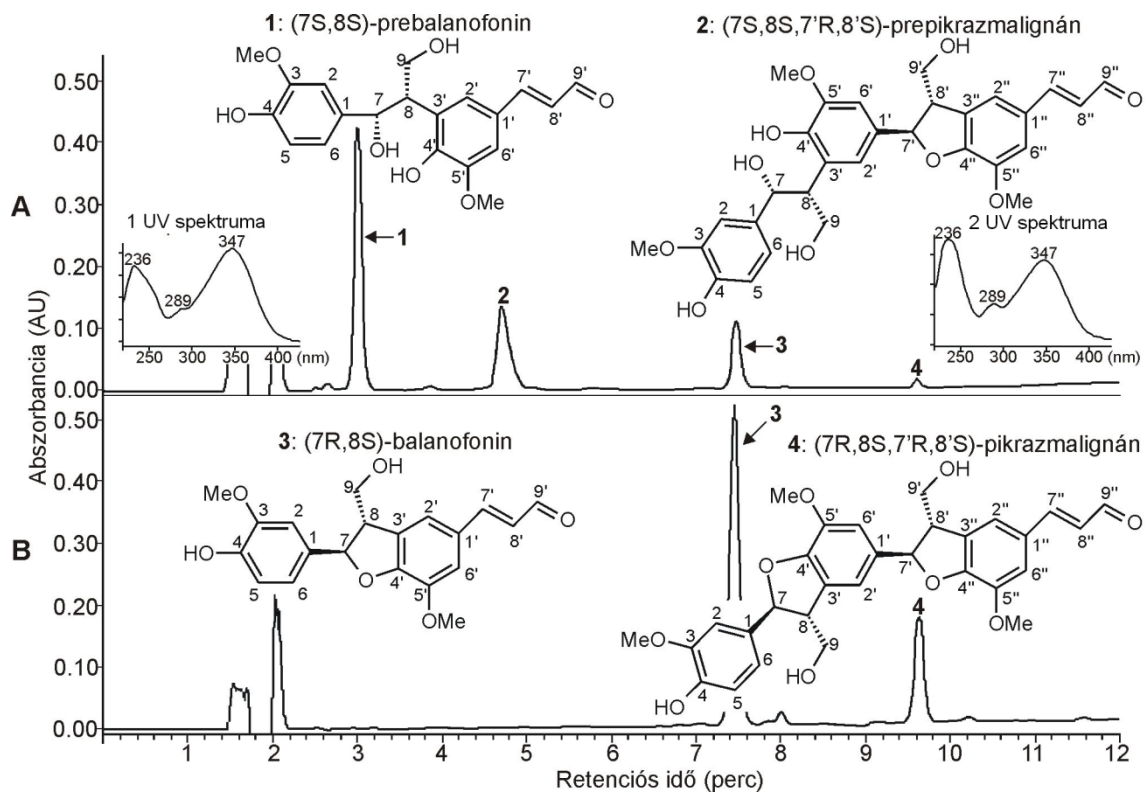


20. ábra. A *Cirsium eriophorum* egész termése, (A) amely csírázott állapotban (B) terméscfal (C) és embrió (D) részekre különül.

Az elkülönített terméscfal és mag kivonatát HPLC-UV módszerrel vizsgálva a magállományban nem találtunk (250 nm és 500 nm hullámhossz közötti tartományban detektálva) összetevőket. Ugyanakkor az elkülönített terméscfalban 347 nm hullámhosszon abszorpciós maximummal rendelkező komponensek mutathatók ki (21. ábra).

A 3-as összetevő HPLC-TOF MS (negatív ionizációs módban) vizsgálatának eredményeként (9. táblázat) a $C_{20}H_{20}O_6$ összegképlet volt számítható, ami a *C. vulgare* termésben azonosított balanofonin összegképletének felel meg.

Emellett a 3 összetevő UV (21. ábra), NMR (10. táblázat) és TMS-származékként mért GC-MS spektruma (22. ábra) szintén megegyezik a balanofonin spektroszkópiás eredményeivel, bizonyítva hogy a *C. eriophorum* termésében lévő 3 ugyancsak a balanofonin. A 4 összetevő spektroszkópiás (HPLC-TOF MS és NMR, 9. és 10. táblázatok) adatai a pikrazmalignán szerkezetét bizonyították irodalmi eredmények alapján [69,78].



21. ábra. A *C. eriophorum* intakt (A) és a savval kezelt (50°C hőmérsékleten) (B) terméskivonatának kromatogramjai (347 nm hullámhosszon detektálva) az azonosított összetevők megnevezésével, szerkezetével és UV spektrumával kiegészítve.

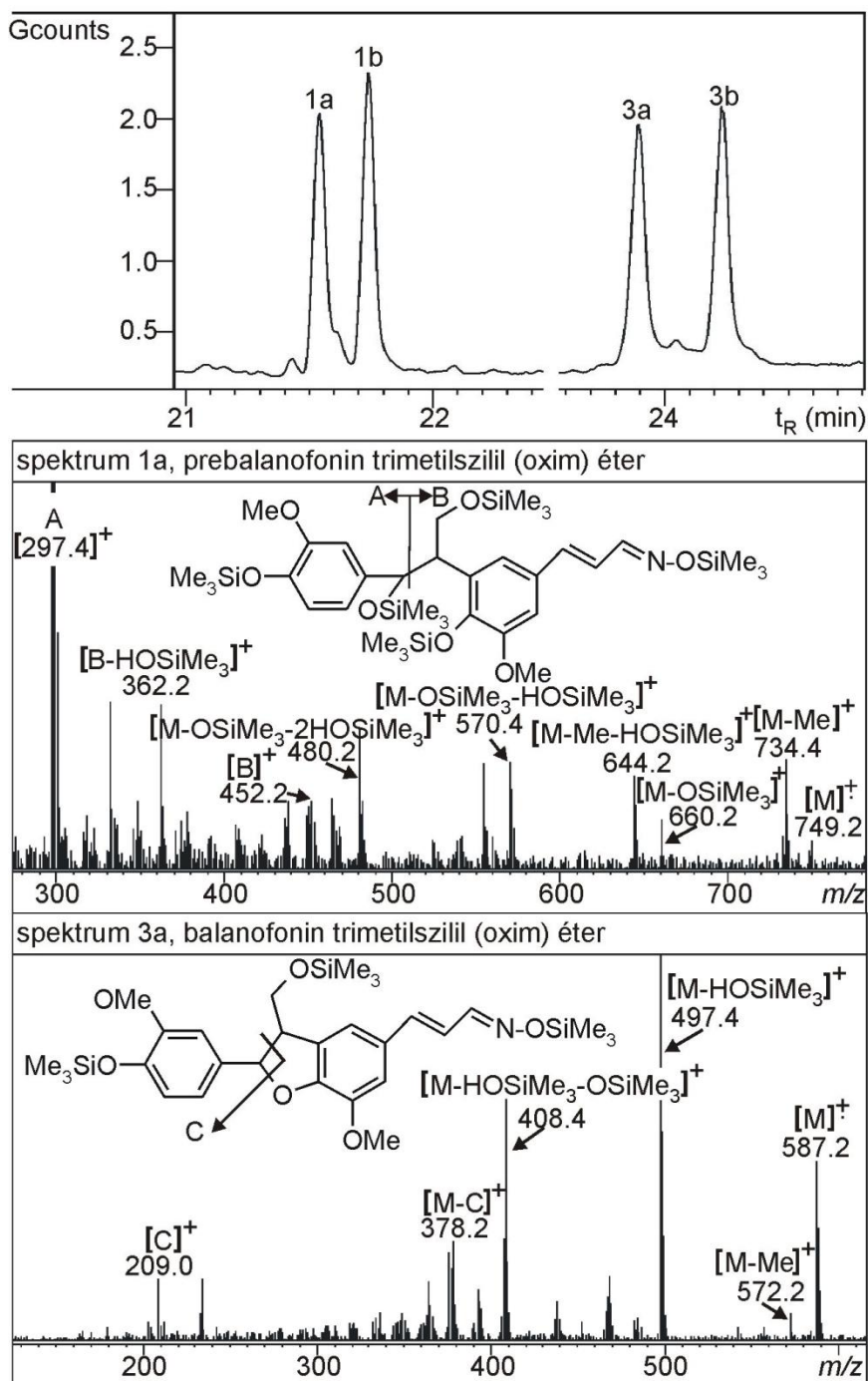
9. táblázat. A *C. eriophorum* terméskivonatából izolált összetevők HPLC-TOF MS (ESI, negatív ion mód) adatai.

Összetevő		Összegképlet	Detektált	Detektált ion	Számolt m/z	Mért m/z	diff (ppm)	Abundance Match
Név								
1	Prebalanofonin	$C_{20}H_{22}O_7$	$C_{20}H_{21}O_7$	$[M-H]^-$	373.1293	373.1286	1.81	91.24
2	Prepikrazmalignán	$C_{30}H_{32}O_{10}$	$C_{30}H_{31}O_{10}$	$[M-H]^-$	551.1923	551.1911	2.12	92.35
3	Balanofonin	$C_{20}H_{20}O_6$	$C_{20}H_{19}O_6$	$[M-H]^-$	355.1187	355.1174	3.69	90.12
4	Pikrazmalignán	$C_{30}H_{30}O_9$	$C_{30}H_{29}O_9$	$[M-H]^-$	533.1807	533.1817	1.89	93.11

10. táblázat. A *Cirsium eriophorum* termésből izolált neolignánok és szeszkvineolignánok ^1H és ^{13}C NMR adatai, metilalkohol- d_4 oldószerben mérve.

Atom*	balanofonin (3)		prebalanofonin (1)		pikrazmalignán (4)		prepikrazmalignán (2)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	131.9	-	136.1	-	134.5	-	136.7
2	6.95 s	109.1	6.76 s	111.3	6.92 s	110.9	6.90 s	109.0
3	-	147.7	-	148.5	-	149.1	-	147.5
4	-	146.9	-	146.6	-	149.6	-	148.9
5	6.79 d (8.1)	114.5	6.68 d (8.2)	115.6	6.76 d (7.9)	115.9	6.78 d (8.1)	118.0
6	6.84 d (8.1)	118.5	6.72 d (8.2)	120.4	6.82 d (7.9)	120.0	6.76 d (8.1)	119.6
7	5.62 d (6.4)	88.2	5.11 d (5.1)	74.5	5.53 d (6.1)	89.4	5.17 d (5.2)	73.1
8	3.56 m	53.1	3.55 m	49.8	3.50 m	55.2	3.40 m	53.9
9	3.81 és 3.85 m	63.8	3.73 és 3.85 m	63.1	3.77 és 3.79 m	64.8	3.68 és 3.75 m	63.5
1'	-	127.9	-	126.3	-	136.0	-	133.3
2'	7.24 s	120.1	7.14 s	127.2	6.94 s	116.2	6.69 s	114.8
3'	-	130.5	-	127.8	-	130.5	-	126.2
4'	-	151.5	-	150.2	-	147.6	-	146.9
5'	-	144.5	-	149.4	-	145.6	-	143.5
6'	7.30 s	112.3	7.16 s	109.9	6.93 s	110.6	6.76 s	110.8
7'	7.65 d (15.7)	154.7	7.56 d (15.7)	157.0	5.65 d (6.4)	90.3	5.52 d (6.1)	87.6
8'	6.69 dd (15.7, 7.8)	125.6	6.62 dd (15.7, 7.8)	126.4	3.61 m	54.7	3.72 m	55.0
9'	9.59 d (7.8)	194.7	9.54 d (7.8)	196.2	3.84 és 3.87 m	64.8	3.77 és 3.93 m	61.4
3-OMe	3.82 s	55.6	3.71 s	56.2	3.81 s	55.2	3.74 s	55.0
5'-OMe	3.92 s	55.8	3.90 s	56.6	3.86 s	56.8	3.77 s	54.9
5''-OMe					3.91 s	56.9	3.88 s	55.1
1''					-	129.7	-	125.2
2''					7.30 s	119.7	7.18 s	125.5
3''					-	131.2	-	127.7
4''					-	152.9	-	148.7
5''					-	146.1	-	143.5
6''					7.24 s	114.3	7.19 s	109.0
7''					7.63 d (15.8)	156.1	7.57 d (15.7)	155.5
8''					6.68 dd (15.8, 7.8)	127.1	6.64 dd (15.7, 7.7)	124.9
9''					9.58 d (7.8)	196.2	9.55 d (7.7)	194.8

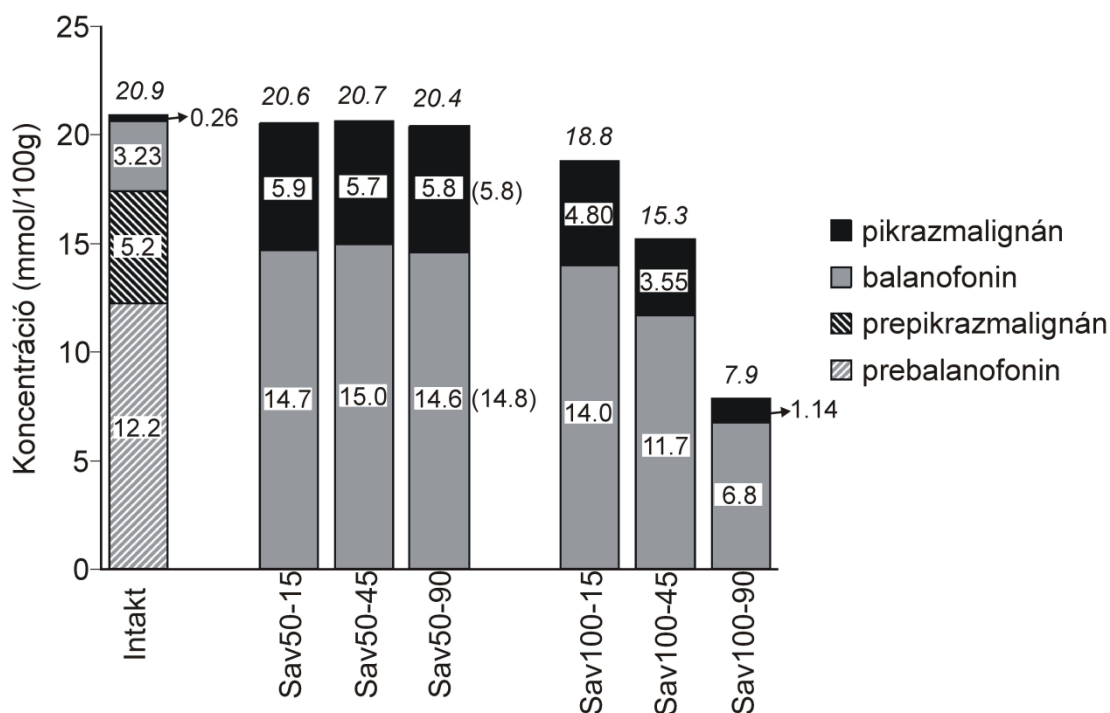
*A C atomok számozása azonos a 21. ábrán lévő molekulák szerkezeti képletén lévő számozással.



22. ábra. A prebalanofonin (1a és 1b; t_R 21.58 perc és t_R 21.77 perc) és a balanofonin (3a és 3b; t_R 23.90 perc és t_R 24.22 perc) trimetilszilil oxim éter származékainak GC-MS kromatogramja fragmentációs folyamataikkal egyben. Mindkét összetevő két csúcs (a és b) formájában detektálható, melyek a trimetilszilil oxim E és Z izomerjei. Egy összetevő két izomerje azonos MS spektrumokkal rendelkezik, ezért csak az egyik kerül mindkét vegyületnél (1a és 3a) bemutatásra.

Valószínűsítettük, hogy a *C. vulgare* termésfalban lévő másik két összetevő (1 és 2) a balanofonin (3) és a pikrazmaligán (4) rokon szerkezetű vegyületei, mivel UV

spektrumuk azokkal azonos (21. ábra, csak az 1 és 2 UV spektrumának feltüntetésével). Az összetevők azonosításában savas közegben történő karakterisztikus átalakulásaik nagy jelentőséggel rendelkeznek (21. és 23. ábra).



23. ábra. A *C. eriophorum* kezeletlen termésfal (Intakt) és a savval 50°C hőmérsékleten 15 percig (Sav50-15), 45 percig (Sav50-45), vagy 90 percig (Sav50-90) melegített, továbbá savval 100°C hőmérsékleten 15 percig (Sav100-15), 45 percig (Sav100-45), vagy 90 percig (Sav100-90) melegített minták összetétele. A döntve írt számok az összetevők összes mennyiségét jelentik a mintákban, a zárójelben lévők pedig a savval 50°C hőmérsékleten eltérő ideig melegített mintákban mért mennyiségek átlagai. Az átalakulások követhetősége érdekében az összetevők mennyiségét a mintákban mmol/100g mennyiségben adtuk meg.

Összehasonlítva a kezeletlen (Intakt) és 50°C hőmérsékleten különböző időtartamokig savval kezelt (Sav50-15, Sav50-45 és Sav50-90) mintákban mért mennyiségeket megállapíthatjuk, hogy az 1 teljes mennyisége balanofonin, míg a 2 teljes mennyisége pikrazmalignán összetevővé alakult át. A savkezelt (50°C hőmérsékleten) mintákban várható, számított balanofonin mennyisége (ami megfelel az 1 és 3 összes mennyiségének az intakt mintában: $12,2 + 3,23 = 15,4$ mmol/100g) megegyezik (mérési hibahatáron belül) az 50°C hőmérsékleten eltérő időtartamokig savval kezelt mintákban mért balanofonin mennyiség átlagával (14,8 mmol/100g) (23. ábra). Hasonlóan teljes mértékű volt a 2 átalakulása pikrazmalignánná 50°C hőmérsékleten. Az 1 és 2 átalakulása balanofonin és pikrazmalignán képződése mellett

100°C-on történő savkezelés hatására szintén végbemegy, de ezen a hőmérsékleten a keletkezett balanofonin és pikrazmalignán bomlása is megfigyelhető. Az 1 és a balanofonin valamint a 2 és a pikrazmalignán molekulatömege közötti eltérésekből (9. táblázat, m/z 18) arra következtethetünk, hogy a savkezelés során az 1-es és a 2-es H₂O kilépés során alakul balanofonin és pikrazmalignán összetevőkké. A balanofonin és a pikrazmalignán dihidrobenzofurán gyűrűrendszere savkatalizált gyűrűzáródással H₂O veszteség során a 21. ábrán feltüntetett, általunk prebalanofonin (1) és prepikrazmalignán (2) néven elnevezett összetevőkből alakulhat ki. Ezek szerkezetét NMR (és a prebalanofonin esetén GC-MS, 22. ábra) adataik egyértelműen bizonyították (10. táblázat).

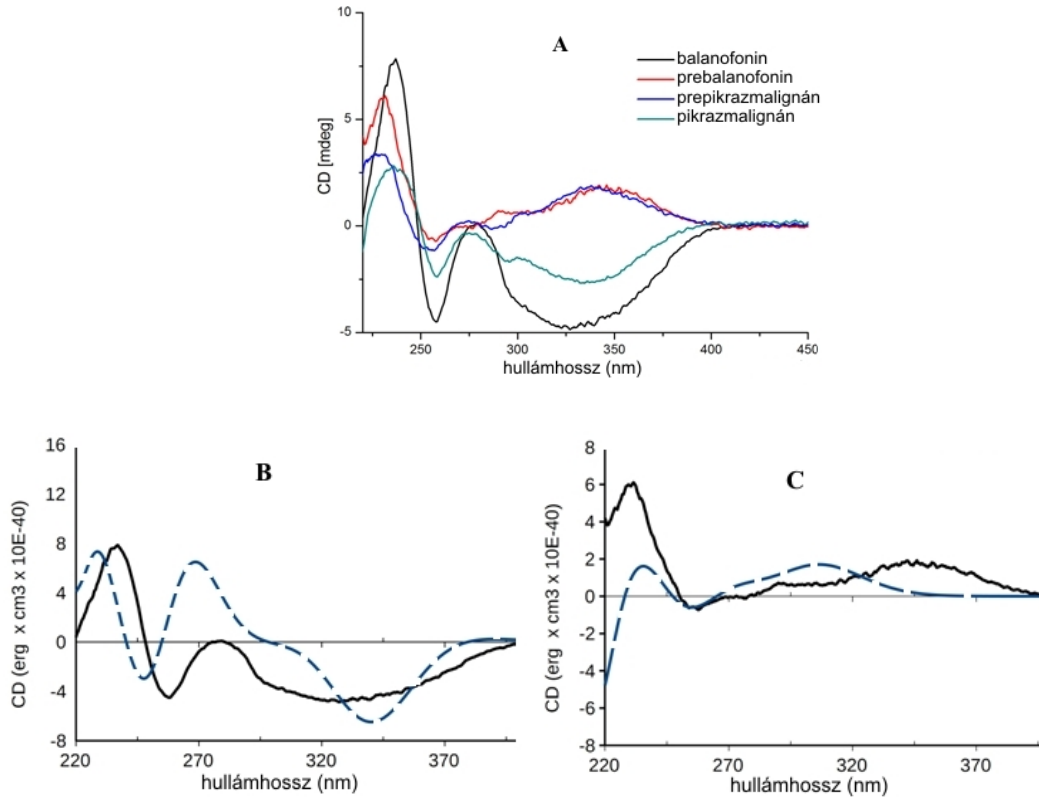
A királis C atomok konfigurációja

A *C. eriophorum* természetesen azonosított összetevők királis molekulák: a balanofonin és prebalanofonin két kiralitás centrumot (C7 és C8 atomok), a pikrazmalignán és a prepikrazmalignán pedig négy kiralitáscentrumot tartalmaz (C7, C8, C7' és C8' atomok). A kiralitáscentrumok konfigurációját NMR és CD spektroszkópiás módszerekkel határoztuk meg (utóbbinál a mért és elméleti számításokkal szimulált spektrumok összehasonlítása alapján).

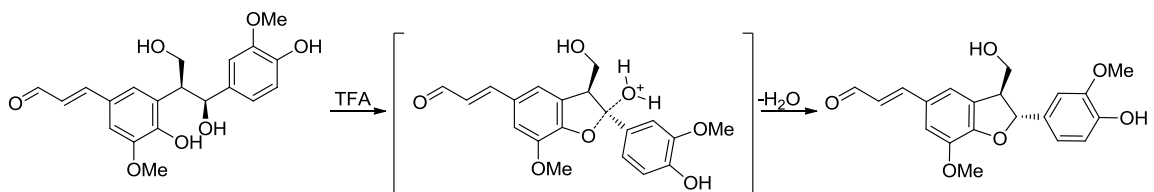
A prebalanofonin C7 és C8 atomjaihoz kapcsolódó hidrogének alacsonyabb csatolási állandóval ($J = 5.1$ Hz) rendelkeznek mint a balanofonin ($J = 6.4$ Hz) esetében (10. táblázat), ami a prebalanofonin C7 és C8 atomjainak cisz konfigurációját bizonyítja. A prebalanofonin lehetséges különböző izomerjeinek számításal előállított CD spektrumainak összehasonlítása a ténylegesen mért CD spektrumával a 7S,8S abszolút konfigurációt bizonyítja (24. ábra). Ezek alapján az 1 összetevőt mint (7S,8S)-prebalanofonin [(7S,8S)-4,4',7,9-tetrahidroxi-3,5'-dimetoxi-8,3'-neolign-7'-en-9'-al] azonosítottuk.

A prepikrazmalignán és pikrazmalignán esetében a közöttük lévő különbség a C7 és C8 atomokhoz kapcsolódó hidrogének csatolási állandójában (10. táblázat) és a CD spektrumaikban a fentebb leírtakkal azonos módon magyarázza a 2 összetevő szerkezetét, mint (7S,8S)-prepikrazmalignán [(7S,8S,7'R,8'S)-4,4',7,9,9'-pentahidroxi-3,5',5"-trimetoxi-4",7'-epoxi-8,3':3"8'-szeszvineolign-7"-en-9"-al].

A gyűrűzáródási reakció tehát együtt jár a C7 szénatom konfigurációjának megváltozásával (inverziójával). A folyamat nukleofil szubsztitúciós reakció (25. ábra), amely általában jellemző a diol típusú vegyületek gyűrűzáródására [78].



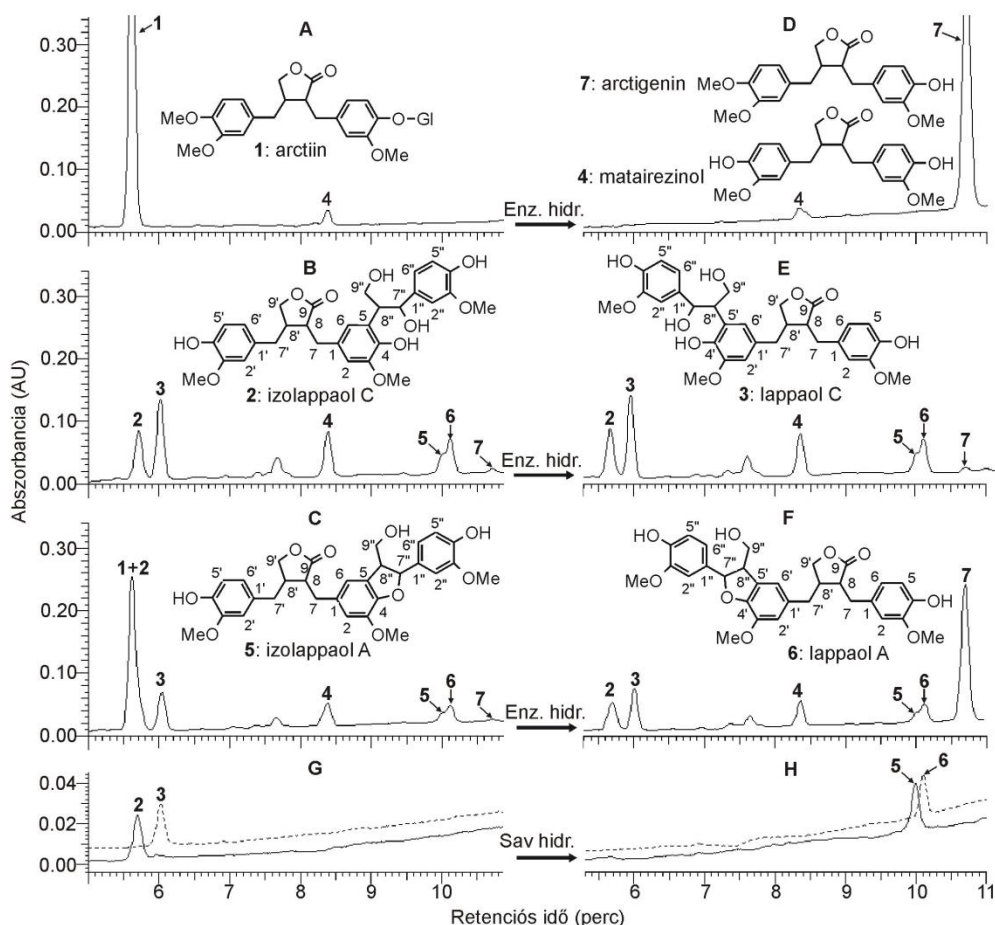
24. ábra. A *Cirsium eriophorum* természetfaj-összetevők mért CD spektrumai (A), a balanofonin mért (fekete folytonos) és számított (kék szaggatott) CD spektruma (B), valamint a prebalanofonin mért (fekete folytonos) és számított (kék szaggatott) spektruma (C).



25. ábra. A (7S,8S)-prebalanofonin savkatalizált gyűrűzáródásának mechanizmusa (7R,8S)-balanofonin képződésével.

5.5. A *Cnicus benedictus* – benedekfű termésének összetétele

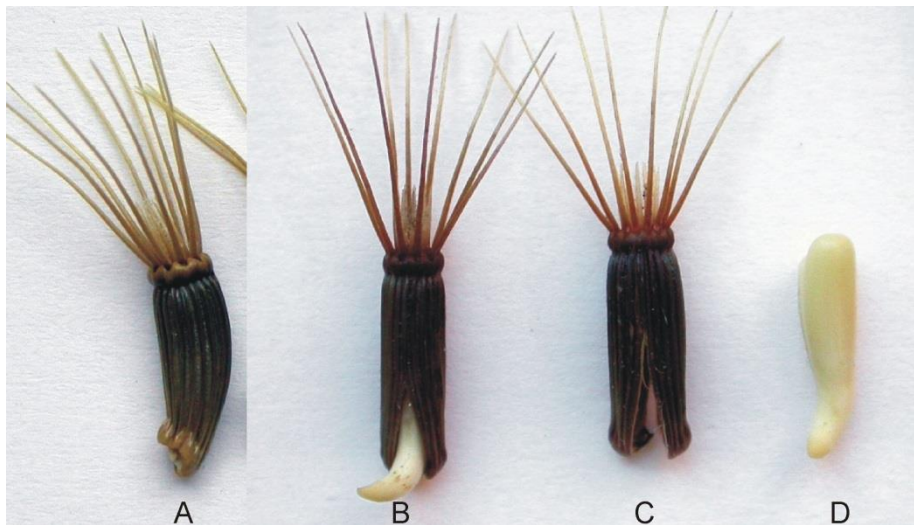
A *Cnicus benedictus* teljes termés hidrolizátlan intakt kivonatának HPLC-UV kromatogramján (26.C ábra) lévő 1+2 és a 7 összetevők a DBBL Li csoportba tartozó glikozid arctiin (1+2) és aglikon párja, az arctigenin (7) retenciós idejénél jelentkeztek. Ismerve a DBBL Li glikozidok jellegzetes enzimatisz átalakulási folyamatát, ami a glikozid összes mennyiségének aglikonná alakulásával jár, összehasonlítottuk az intakt (26.C ábra) és az enzimmal hidrolizált teljes termés összetételét (26.F ábra). Az 1+2 csúcshoz tartozó összetevő teljes mennyisége azonban nem alakult át arctigeninné 180 perc hidrolízis idő elteltével (és hosszabb enzimatisz hidrolízis után sem). Ez arra utal, hogy az arctiin glikoziddal azonos retenciós idővel rendelkező ismeretlen összetevő is jelen van a termésben.



26. ábra. Az intakt kezeltlen embrió (A), termésfal (B) és egész termés (C) és ezek enzimhidrolizált változatainak (D, E és F) valamint az izolált, kezeltlen összetevők (G: izolalppal C: folytonos és lappal C: szaggatott vonallal) és ezek savkezelte változatainak (H; izolalppal A: folytonos és lappal A: szaggatott vonallal) HPLC-UV ($\lambda=280$ nm) elválasztása.

A termés csírázás során (27. ábra) elkülönült embrió (26.A és 26.D ábra) és termésfal részeinek (26.B és 26.E ábra) összetételét hidrolízis nélkül (26.A és 26.B ábra) és enzimés hidrolízist követően (26.D és 26.E ábra) vizsgálva megállapítottuk, hogy

- 1.) az arctiin a termés embrió részében van csak jelen, mely
- 2.) enzimatis hidrolízissel arctigeninné alakulhat;
- 3.) az arctiinnel azonos (2) és egy későbbi retenciós idejű (3), továbbá az 5 és 6 összetevők a termés fal állományában halmozódtak fel,
- 4.) melyek mennyiségét nem befolyásolja az enzimkezelés.



27. ábra. A *Cnicus benedictus* egész termése (A) amely csírázott állapotban (B) termésfal (C) és embrió (D) részekre különül.

Az intakt és enzimhidrolizált embrió kivonatainak HPLC-TOF MS és TMS származékainak GC-MS adatai az arctiin és arctigenin, továbbá a 4 összetevő (matairezinol) szerkezetét bizonyították (adatok nem kerülnek bemutatásra, korábbi mérésekkel megegyeztek [17]).

A termésfalból izolált 2 és 3 összetevők savkezelés hatására az 5 és 6 vegyületekké alakultak. Ezen négy összetevő HPLC-TOF MS adatainak összehasonlításával valószínűsíthető, hogy ez az átalakulás H_2O kilépéssel járó folyamat (11. táblázat).

11. táblázat. A *Cnicus benedictus* elkülönített termésfalából izolált szeszkvineolignánok HPLC-TOF MS (ESI, pozitív ion mód) adatai.

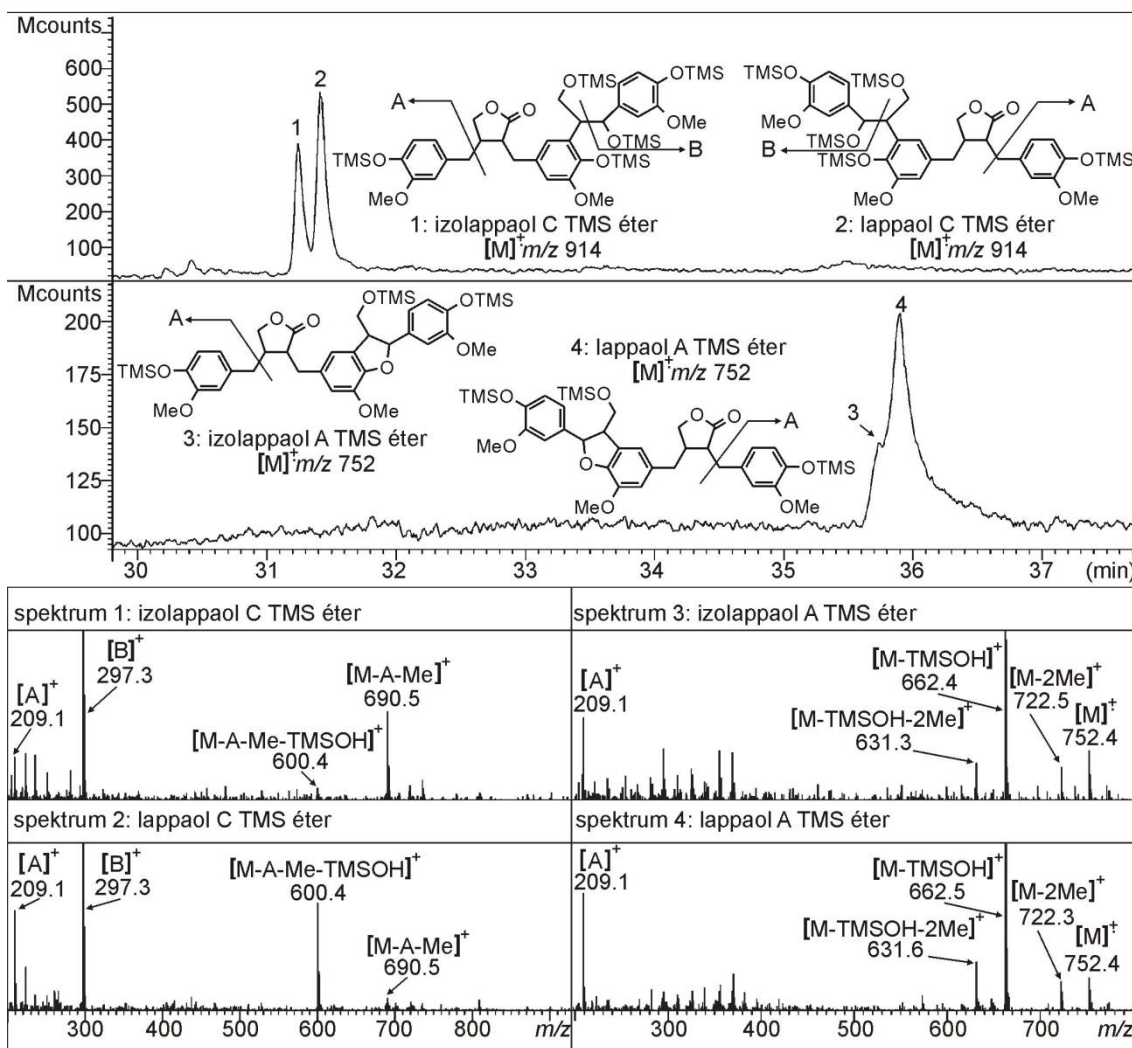
Összetevő		Összegképlet	Detektált	Detektált ion	Számolt m/z	Mért m/z	diff (ppm)
Szám	Név						
2	izolappaol C	$C_{30}H_{34}O_{10}$	$C_{30}H_{38}NO_{10}$	$[M+NH_4]^+$	572.2490	572.2463	4.63
3	lappaol C	$C_{30}H_{34}O_{10}$	$C_{30}H_{38}NO_{10}$	$[M+NH_4]^+$	572.2490	572.2465	4.51
5	izolappaol A	$C_{30}H_{32}O_9$	$C_{30}H_{36}NO_9$	$[M+NH_4]^+$	554.2385	554.2364	4.00
6	lappaol A	$C_{30}H_{32}O_9$	$C_{30}H_{36}NO_9$	$[M+NH_4]^+$	554.2385	554.2366	3.34

A *Cirsium eriophorum* termésösszetevői esetén a savkezelés során H_2O kilépéssel lezajló gyűrűzáródással dihidrobenzofurán gyűrűrendszer kialakulása volt megfigyelhető (5.4. fejezet). Feltételeztük, hogy a *Cnicus benedictus* 2 és 3 összetevőinek savkatalizált átalakulásakor (5 és 6 képződésekor) a dihidrobenzofurán struktúra szintén kialakul, és jelen van az 5 és 6 összetevőkben (26. ábra). A HPLC-TOF MS eredményéből számított összegképlet az 5 és 6 molekulára egyaránt $C_{30}H_{32}O_9$ volt. Ilyen összegképlettel és dihidrobenzofurán struktúrával rendelkező ismert vegyület a SeNeLi típusú lappaol A és izolappaol A. Ezek dihidrobenzofurán struktúrája a savkatalizált gyűrűzáródással a szintén SeNeLi típusú lappaol C és izolappaol C összetevőkből alakulhat ki (26. ábra). A molekulák szerkezetét NMR adataik (12. táblázat) és TMS származékaik GC-MS spektrumai (28. ábra) egyértelműen bizonyítják.

12. táblázat. A *Cnicus benedictus* termésfalában lévő szeszkvineolignánok ¹H és ¹³C NMR adatai CDCl₃ oldószerben mérve.

Atom*	lappaol A		izolappaol A		lappaol C		izolappaol C	
	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C
1	-	129.1	-	127.8	-	129.6	-	128.4
2	6.68 <i>d</i> (1.8)	111.4	6.62 <i>d</i> (2.0)	110.9	6.64 <i>d</i> (1.8)	111.6	6.43 <i>d</i> (1.8)	124.1
3	-	146.7	-	146.1	-	146.6	-	147.5
4	-	144.0	-	143.8	-	144.5	-	144.2
5	6.80 <i>d</i> (7.8)	113.9	-	132.8	6.81 <i>d</i> 7.8	114.1	-	126.2
6	6.61 <i>dd</i> (7.8, 1.8)	119.8	6.52 <i>d</i> (2.0)	116.6	6.59 <i>dd</i> (7.8, 1.8)	122.1	6.32 <i>d</i> (1.8)	111.3
7	2.98 <i>dd</i> (13.8, 5.2) 2.92 <i>dd</i> (13.8, 7.0)	34.5	2.93 <i>dd</i> (13.8, 6.5) 2.96 <i>dd</i> (13.8, 5.0)	34.3	2.95 <i>dd</i> (14.0, 5.4) 2.88 <i>dd</i> (14.0, 7.0)	34.5	2.83 <i>dd</i> (14.3, 6.5) 2.77 <i>dd</i> (14.3, 5.5)	34.5
8	2.56 <i>m</i>	46.5	2.60 <i>m</i>	46.7	2.52 <i>m</i>	46.6	2.39 <i>m</i>	46.4
9	-	178.4	-	178.1	-	178.7	-	178.4
1 [°]	-	128.1	-	129.4	-	124.7	-	130.2
2 [°]	6.42 <i>d</i> (2.0)	112.6	6.42 <i>d</i> (1.8)	113.2	6.32 <i>d</i> (1.8)	108.7	6.47 <i>d</i> (1.8)	112.5
3 [°]	-	143.2	-	143.4	-	146.9	-	147.3
4 [°]	-	145.6	-	145.6	-	142.6	-	145.8
5 [°]	-	132.7	6.76 <i>d</i> (7.8)	114.2	-	129.1	6.72 <i>d</i> (8.5, 1.8)	114.4
6 [°]	6.54 <i>d</i> (2.0)	116.2	6.52 <i>dd</i> (1.8, 7.8)	121.1	6.35 <i>d</i> (1.8)	122.7	6.36 <i>d</i> (8.5)	121.6
7 [°]	2.66 <i>dd</i> (13.5, 6.1) 2.54 <i>dd</i> (13.5, 8.0)	38.1	2.63 <i>dd</i> (13.8, 6.0) 2.53 <i>dd</i> (13.8, 8.0)	38.1	2.65 <i>dd</i> (13.6, 6.1) 2.56 <i>dd</i> (13.6, 7.8)	37.8	2.56 <i>dd</i> (14.0, 6.8) 2.48 <i>dd</i> (14.0, 7.8)	37.8
8 [°]	2.51 <i>m</i>	40.8	2.49 <i>m</i>	41.1	2.41 <i>m</i>	41.0	2.36 <i>m</i>	41.0
9 [°]	4.17 <i>dd</i> (9.2, 7.5) 3.90 <i>dd</i> (9.2, 7.0)	71.0	4.15 <i>dd</i> (9.0, 7.5) 3.90 <i>dd</i> (9.0, 7.0)	71.1	4.04 <i>dd</i> (9.5, 7.5) 3.88 <i>dd</i> (9.5, 6.5)	71.1	3.98 <i>dd</i> (9.0, 7.5) 3.75 <i>dd</i> (9.0, 6.0)	71.0
1 ^{''}	-	130.8	-	130.6	-	134.1	-	134.8
2 ^{''}	6.92 <i>d</i> (1.8)	108.9	6.92 <i>d</i> (1.8)	108.8	6.80 <i>d</i> (2.0)	109.8	6.75 <i>d</i> (2.0)	110.1
3 ^{''}	-	146.5	-	146.2	-	146.3	-	146.5
4 ^{''}	-	144.1	-	144.2	-	145.0	-	145.1
5 ^{''}	6.85 <i>d</i> (7.8)	114.2	6.85 <i>d</i> (7.8)	114.1	6.81 <i>d</i> (7.8)	113.8	6.65 <i>d</i> (8.0)	114.1
6 ^{''}	6.88 <i>dd</i> (1.8, 7.8)	118.5	6.88 <i>dd</i> (1.8, 7.8)	118.5	6.78 <i>dd</i> (7.8, 2.0)	119.1	6.70 <i>dd</i> (8.0, 2.0)	119.1
7 ^{''}	5.49 <i>d</i> (6.4)	87.2	5.50 <i>d</i> (6.4)	87.3	5.15 <i>d</i> (7.2)	74.3	5.20 <i>d</i> (6.6)	73.4
8 ^{''}	3.52 <i>br. m</i>	53.4	3.52 <i>m</i>	53.4	3.42 <i>m</i>	50.7	3.45 <i>m</i>	50.9
9 ^{''}	3.90 <i>m</i>	63.8	3.90 <i>m</i>	63.8	3.81 <i>m</i>	63.0	3.84 <i>m</i>	62.8
O-CH ₃ (3)	3.75 <i>s</i>	55.3	3.83 <i>s</i>	55.7	3.74 <i>s</i>	55.2	3.76 <i>s</i>	55.6
O-CH ₃ (3 [°])	3.82 <i>s</i>	54.9	3.78 <i>s</i>	55.7	3.79 <i>s</i>	54.8	3.81 <i>s</i>	55.6
O-CH ₃ (3 ^{''})	3.78 <i>s</i>	54.9	3.75 <i>s</i>	56.1	3.80 <i>s</i>	54.8	3.72 <i>s</i>	55.2

*A C atomok számozása azonos a 21. ábrán lévő molekulák szerkezeti képletén lévő számozással.

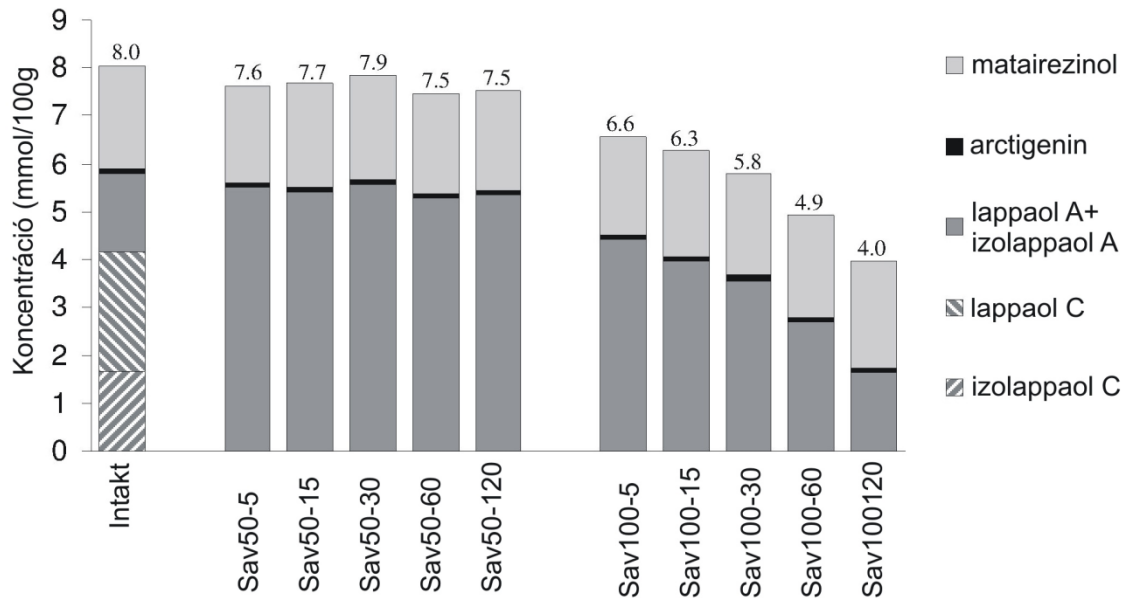


28. ábra. A *Cnicus benedictus* terméscsalában lévő szeszkvineolignánok [izolappaol C (1), lappaol C (2), izolappaol A (3) és lappaol A (4)] TMS éter származékainak GC-MS kromatogramja és a MS spektrumai a fragmentációs folyamatok feltüntetésével.

A terméscsal SeNeLi összetevőinek savkatalizált átalakulását a savkezelés hőmérsékletének és időtartamának függvényében vizsgálva (29. ábra) megállapíthatjuk, hogy

- 1.) a lappaol C és izolappaol C 50°C és 100°C hőmérsékleten egyaránt átalakul lappaol A és izolappaol A molekulákká;
- 2.) az átalakulás gyors, már 5 perc elteltével mindkét hőmérsékleten lezajlik és
- 3.) a keletkező lappaol A és izolappaol A 50°C hőmérsékleten stabil marad hosszabb (120 perc) kezelés után is;

4.) 100 °C hőmérsékleten ezzel szemben a lappaol A és izolappaol A elbomlik (ismeretlen bomlástermékekké).



29. ábra. A kezeletlen terméshal (Intakt) és a savval 50°C hőmérsékleten 5 percig (Sav50-5), 15 percig (Sav50-15), 30 percig (Sav50-30), 60 percig (Sav50-60), vagy 120 percig (Sav50-120), továbbá savval 100°C hőmérsékleten 5 percig (Sav100-5), 15 percig (Sav100-15), 30 percig (Sav100-30), 60 percig (Sav100-60) vagy 120 percig (Sav100-120) melegített terméshal minták összetétele. Az átalakulások követhetősége érdekében az összetevők mennyiségét a mintákban mmol/100g mennyiségben adtuk meg.

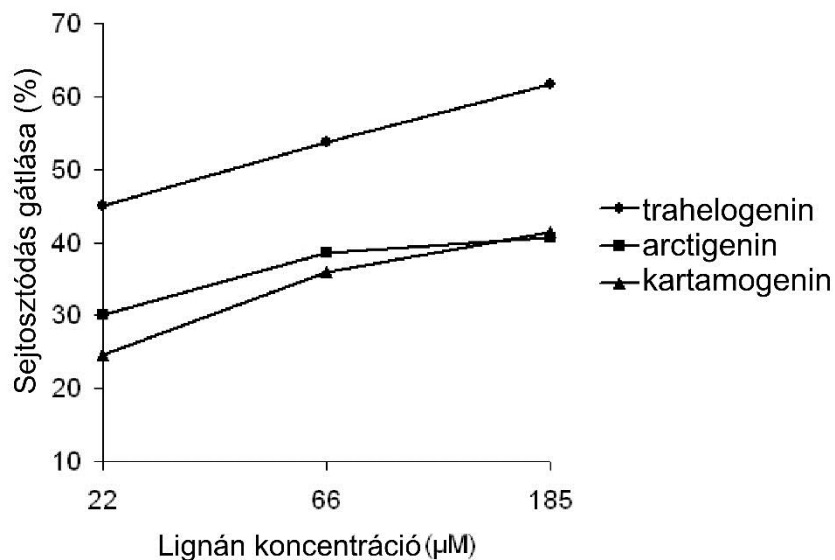
5.6. Izolált összetevők hatása SW480 vastagbél-daganatsejtekre in vitro

5.6.1. A sejtosztódás gátlása

A *Leuzea carthamoides* termésének elkülönített embrió állományából enzimes hidrolízist követően a DBBL Li aglikon kartamogénint és trahelogénint izoláltuk preparatív HPLC módszerrel (5.1. fejezet). Sejtosztódást gátló (antiproliferatív) hatásukat SW480 vastagbél-daganatsejteken vizsgáltuk pozitív kontrollként standard arctigenin (szintén DBBL Li aglikon) felhasználásával (30. ábra). Mindhárom vegyület koncentrációfüggően gátolta a sejtosztódást, először bizonyítva

- 1.) a kartamogénin ilyen irányú hatását és
- 2.) a trahelogénin SW480 sejteken kifejtett hatását.

A három vegyület közül a sejtosztódást a trahelogénin gátolta legerősebben (IC_{50} : 65 μ M).

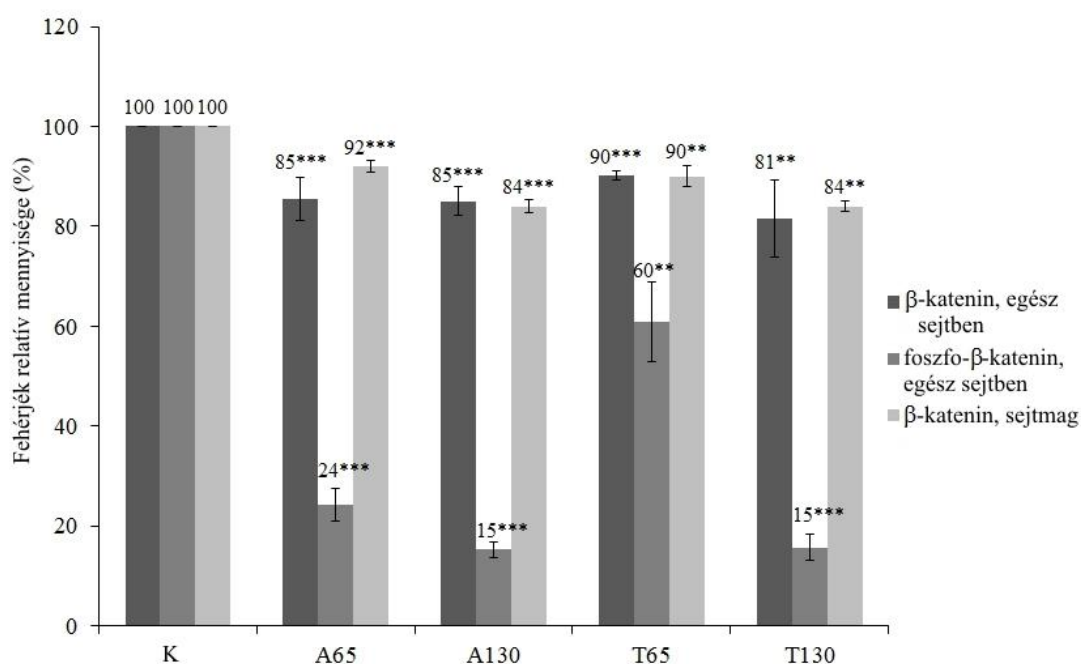


30. ábra. Dibenzilbutirolakton lignánok (izolált: kartamogénin, trahelogenin és standard arctigenin) SW480 vastagbél-daganatsejtek osztódását gátló hatása 48 óra kezelési idő után. Az eredmények nyolc párhuzamos mérésből lettek számítva. A párhuzamos mérések relatív standard deviáció (RSD) értékei 3,4 RSD% (22 μ M arctigenin) és 5,9 RSD% (185 μ M kartamogénin) között változtak.

5.6.2. A sejtosztódás gátlás mechanizmusának vizsgálata - Wnt/ β -katenin jelátviteli út befolyásolása

A *Cirsium brachycephalum* enzimhidrolizált terméseiből izolált trahelogenin birtokában a sejtosztódást-gátló hatás mechanizmusát tanulmányoztuk. Kontrollként standard arctigenin került felhasználásra.

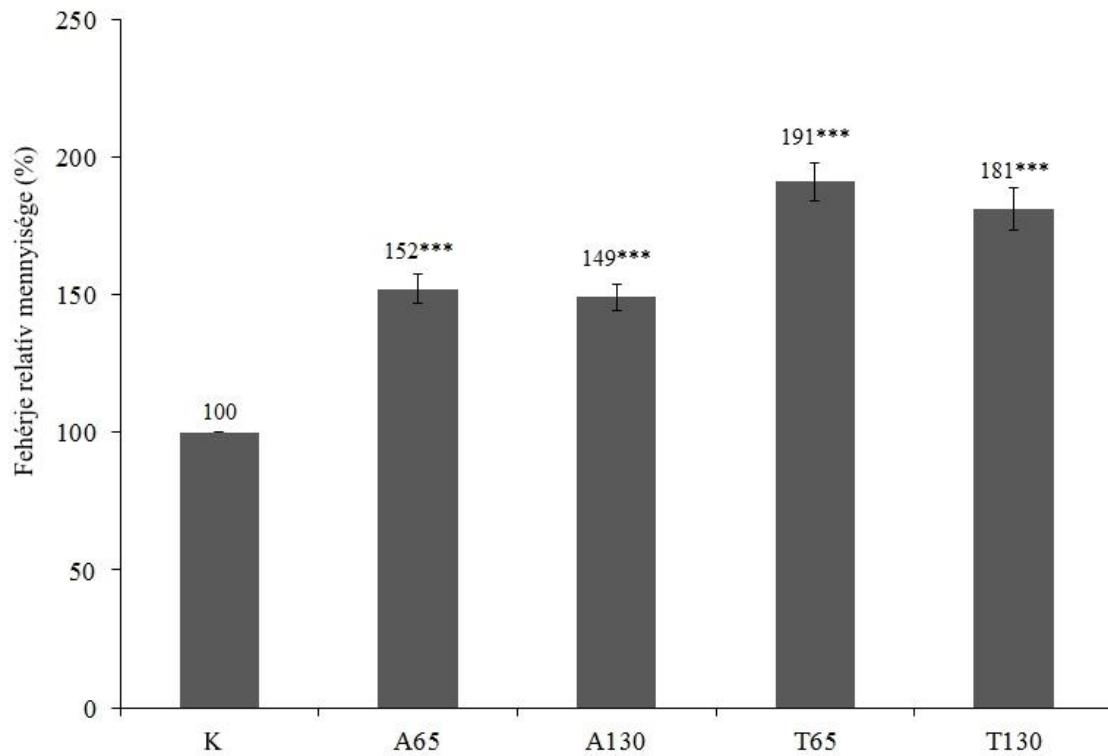
A Wnt/ β -katenin jelátviteli útban sejtosztódást elősegítő faktorként számon tartott β -katenin mennyiségét mértük a teljes sejtben és külön a magban is. A β -katenin mennyisége mindkét DBBL Li hatására (koncentrációtól függetlenül) kismértékben csökkent a magban és a teljes sejtben egyaránt. Ez a trahelogenin esetében először leírt mechanizmus hozzájárulhat a DBBL Li-ok sejtosztódást gátló hatásához. A β -katenin inaktív formája a foszfo- β -katenin, melynek mennyisége viszont a várttól ellentétes módon jelentősen csökkent a kezelt sejtekben (31. ábra). Ennek magyarázata lehet a foszfo- β -katenin gyors proteozómális lebomlása.



31. ábra. 65 és 130 μ M arctigenin (A65 és A130) valamint 65 és 130 μ M trahelogenin (T65 és T130) hatása SW480 teljes sejt β -katenin és foszfo- β -katenin szintjére, továbbá a sejtmagbeli β -katenin mennyiségére 48 óra kezelési idő után a kezeletlen kontroll (K) sejtekkel összehasonlítva. Az eredmények nyolc párhuzamos mérésből lettek számítva; ** $P < 0.01$ és *** $P < 0.001$ (kontrollal összehasonlítva).

A β -katenin többek között a c-Myc protoonkogén fehérje termelődésének megemelésével fokozza a sejtosztódást. A c-Myc foszforilálódással inaktívulódik, így a foszfo-c-Myc mennyiséget növelő vegyületek antiproliferatív hatástúak. A trahelogenin

és arctigenin SW480 sejtekben megemelte a foszfo-c-Myc koncentrációját, először bizonyítva a DBBL Li típusú vegyületek ilyen hatásmechanizmusát (32. ábra).



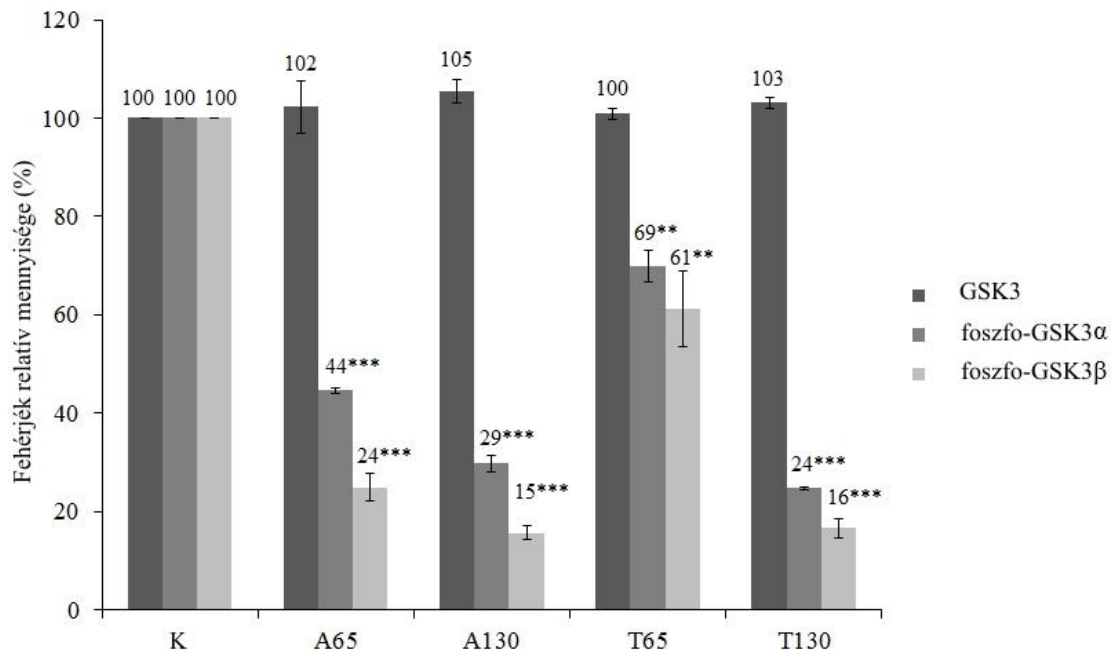
32. ábra. 65 és 130 μ M arctigenin (A65 és A130) valamint 65 és 130 μ M trahelogenin (T65 és T130) hatása SW480 sejtek foszfo-c-Myc szintjére 48 óra kezelési idő után a kezeletlen kontroll (K) sejtekkel összehasonlítva. Az eredmények nyolc párhuzamos mérésből lettek számítva; *** P < 0.001 (kontrollal összehasonlítva).

A Wnt/ β -katenin jelátvitel folyamatában a GSK3 fehérjék (GSK3 α és GSK3 β) a β -katenin és c-Myc inaktiválásával (foszforilálásukkal) sejtosztódást gátló szereppel rendelkeznek, aktivátorai ezért antiproliferatív hatásúak lehetnek. Tanulmányoztuk a DBBL Li kezelések hatását

- 1.) a GSK3 aktív és inaktív (foszfo-GSK3 α és foszfo-GSK3 β) formáinak összes mennyiségére (az ellenanyag tulajdonságából adódóan a foszforilálatlan és a foszforilált formák összes mennyiségét lehet így mérni) és
- 2.) a foszfo-GSK3 α és foszfo-GSK3 β mennyiségére is (külön-külön mérhető a két foszforilált forma).

A GSK3 összes mennyiségét egyik DBBL Li sem befolyásolta. Ugyanakkor az inaktív formák (foszfo-GSK3 α és foszfo-GSK3 β) mennyiségét az arctigenin és a trahelogenin egyaránt koncentrációfüggően, jelentősen csökkentette, azaz a

hatóanyagaink a GSK3 aktív és inaktív formáinak arányát az aktív javára változtatták meg (33. ábra).



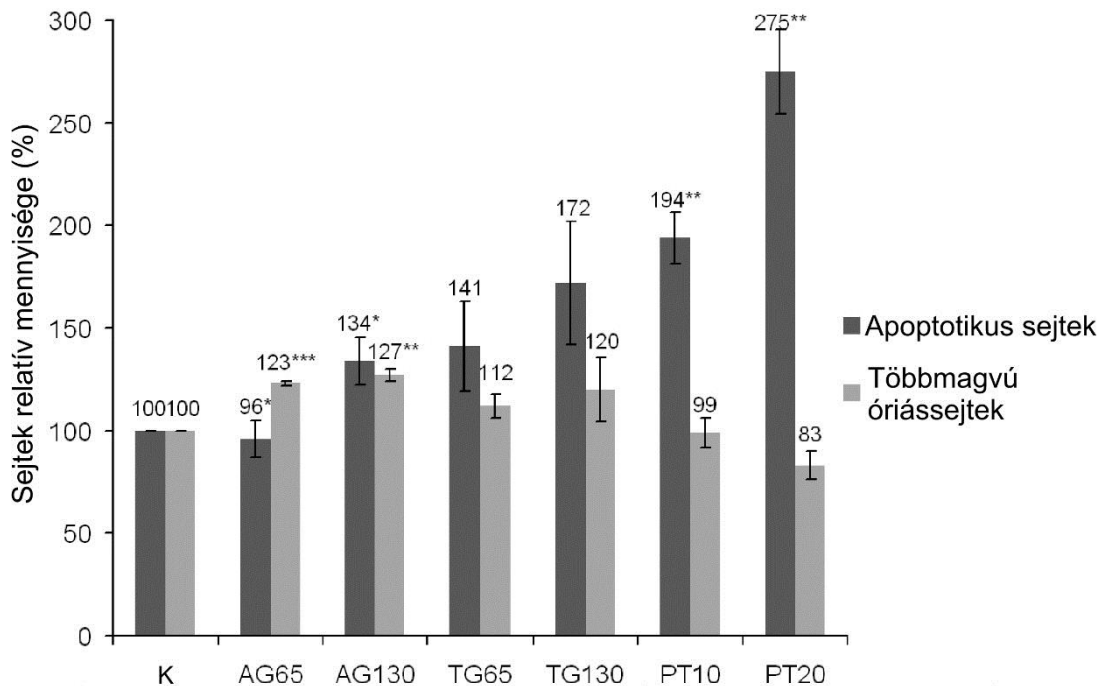
33. ábra. 65 és 130 μ M arctigenin (A65 és A130) valamint 65 és 130 μ M trahelogenin (T65 és T130) hatása az SW480 sejtek GSK3, foszfo-GSK3 α és foszfo-GSK3 β szintjére 48 óra kezelési idő után, a kezeltlen kontrollal (K) összehasonlítva; az adatok 8 mérés átlagai \pm SD; ** P < 0.01 és *** P < 0.001 (kontrollal összehasonlítva).

5.6.3. A mikrotubuláris rendszerre kifejtett hatások

Vizsgálataink során az általunk izolált arctigenin és trahelogenin mikrotubuláris rendszert befolyásoló hatásait vizsgáltuk az ismert mikrotubulus gátló podofillotoxin hatásával összehasonlítva SW480 sejteken. Erre a célra a termésekből izolált DBBL Li-okat (arctigenin, trahelogenin) és standard podofillotoxint használtunk. Az arctigenin a *Serratula tinctoria*, a trahelogenin a *Cirsium brachycephalum* enzimmal hidrolizált terméséből került kinyerésre.

5.6.3.1. Sokmagvú óriássejtek képződése és apoptózis fokozása

A DBBL Li-ok közül az arctigenin sokmagvú óriássejtek megjelenését és apoptózist kiváltó egymással összefüggő hatásai ismertek, melyeket vizsgálataink is megerősítettek. Emellett a trahelogenin óriássejt képződést és apoptózist fokozó hatásait először bizonyítottuk (34. ábra).

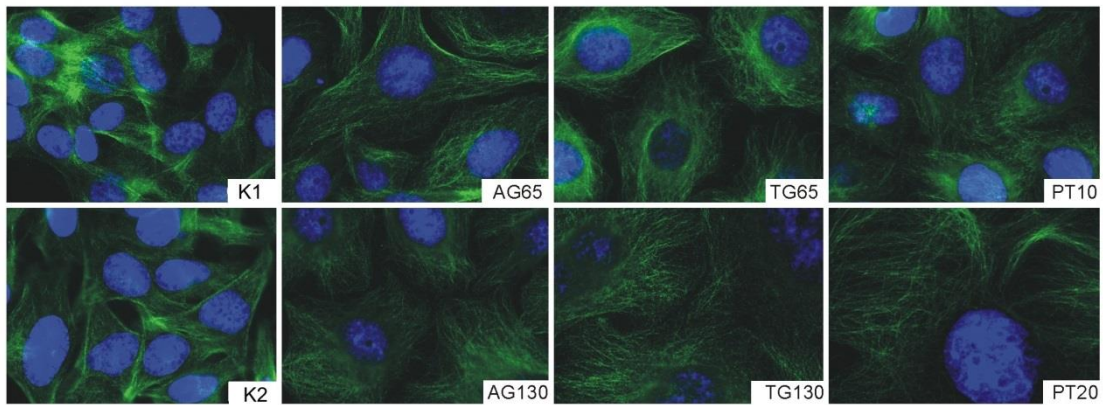


34. ábra. 65 és 130 μ M arctigenin (AG65 és AG130), 65 és 130 μ M trahelogenin (TG65 és TG130) valamint 10 nM és 20 nM podofillotoxin (PT10 és PT20) hatása óriássejtek és apoptotikus sejtek mennyiségére [a kontrollhoz (K) viszonyítva, %-ban kifejezve] 72 óra kezelési idő után. Az adatok 8 mérés átlagai \pm SD; * $P < 0.05$ és ** $P < 0.01$ (kontrollal összehasonlítva).

A trahelogenin az arctigeninnél hatékonyabbnak bizonyult. A podofillotoxin apoptózist kiváltó hatása nagyon erős, aminek következményeként a keletkezett óriássejtek gyorsabban bomlanak le, így mennyiségük csökkenhetett (a nagyobb, 20 nM podofillotoxin koncentráció esetén).

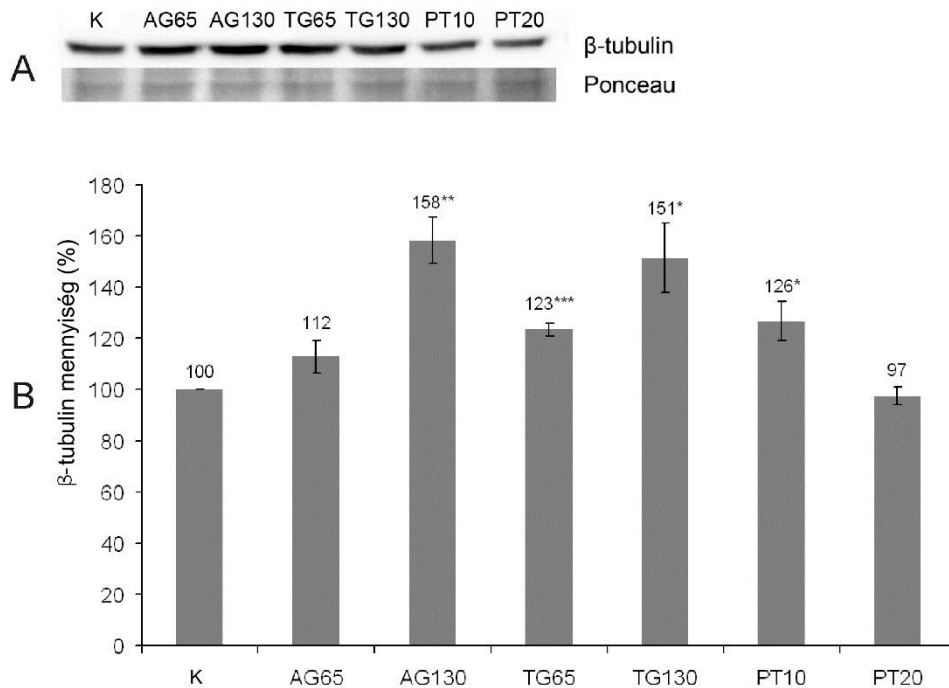
5.6.3.2. Mikrotubulus rendszer gátlása

A mikrotubulus rendszer felépítését a kezelt és kezeletlen sejtekben fluorescens immuncitokémiai módszerrel (4.10.2. fejezet) összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a mikrotubulusok rendezettsége és mennyisége az arctigenin, trahelogenin és podofillotoxin kezelés hatására egyaránt csökkent (35. ábra).



35. ábra. 65 és 130 μM arctigenin (AG65 és AG130), 65 és 130 μM trahelogenin (TG65 és TG130) valamint 10 nM és 20 nM podofillotoxin (PT10 és PT20) hatása az SW480 sejtek mikrotubulus rendszerére; fluorescens immuncitokémiai módszerrel vizsgálva, a kezeletlen kontroll (K1 és K2) sejtekkel összehasonlítva (nagyítás: 60 \times).

A β -tubulin mennyiség (Western-blot módszerrel mérve, 4.10.4. fejezet) viszont megemelkedett az arctigeninnel és trahelogeninnel kezelt sejtekben (koncentrációfüggően) és a 10 nM koncentrációjú podofillotoxin kezelésnél (36. ábra).



36. ábra. 65 és 130 μM arctigenin (AG65 és AG130), 65 és 130 μM trahelogenin (TG65 és TG130) valamint 10 nM és 20 nM podofillotoxin (PT10 és PT20) hatása SW480 sejtek β -tubulin szintjére [a kontrollhoz (K) viszonyítva, %-ban kifejezve] 72 óra kezelési idő után. Az adatok 8 mérés átlagai \pm SD; $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ és *** $P < 0.001$ (kontrollal összehasonlítva).

A podofillotoxin hatásmechanizmusának ismeretében [44] az arctigenin és trahelogenin mikrotubuláris rendszert befolyásoló hatásai különbözőképpen magyarázhatók:

- 1.) a mikrotubulus gátlást kompenzáló, a β -tubulin fokozott szintézisét váltják ki és/vagy
- 2.) fokozzák a mikrotubulus leépülést β -tubulin felszabadulással.

6. Megbeszélés

6.1. A tanulmányozott termékek összetételének összehasonlítása az azonosított vegyületek növényvilágbeli előfordulásával

Vizsgálataink eredményeit és jelentőségét az alábbiakban foglalom össze, összevetve azokat a tanulmányozott fajokban meghatározott összetevők növényvilágban való előfordulásával:

1.) Két, a növényvilágban eddig nem ismert természetes összetevő (prebalanofonin és prepikrazmalignán) került kimutatásra a *Cirsium eriophorum* termésfalában, mint fő- és nagymennyiségű (45,7 mg/g és 28,8 mg/g) összetevők, biztosítva szükség szerinti izolálásuk lehetőségét.

2.) Korábban már ismert szerkezetű összetevők olyan új forrásait azonosítottuk először, melyek a kérdéses vegyületet/vegyületeket

2.1.) a korábbi forrásaiknál számottevően nagyobb mennyiségben tartalmazzák:

- a *Cirsium eriophorum* savkezelt (50°C hőmérsékleten) termésfal mintájának balanofonin és pikrazmalignán tartalma (13. táblázat, 52,7 mg/g és 31,0 mg/g) \approx 2000-szer (!) és $\approx 10^6$ -szor (!) több, mint az eddigi forrásoké (3. táblázat, [60,69]),

- a *Cnicus benedictus* intakt termésfal lappaol C és izalappaol C tartalma (13. táblázat, 23,1 mg/g) \approx 7-szer, míg a savkezelt (50°C hőfokon) változatának lappaol A és izalappaol A tartalma (13. táblázat, 31,1 mg/g) \approx 250-szer több, mint az eddigi forrásoké [62,52],

- a *Cirsium brachycephalum* intakt termésének trahelozid- és enzimkezelt változatának trahelogenin tartalma (13. táblázat, 24,4 mg/g és 17,2 mg/g) \approx kétszer több, mint az eddigi legjobb forrásé (*Cirsium arvense* termés) [16] vagy

2.2.) a korábbi, kiemelkedően magas Li tartalommal rendelkező forrással (*Arctium lappa* [17]) összevethető, rendkívül nagy hatóanyag-tartalommal rendelkeznek: *Serratula tinctoria* termésének kezeletlen intakt és enzimmal hidrolizált változata (13. táblázat, arctiin 75,4 mg/g és arctigenin 56,0 mg/g).

Az eddigieket összefoglalva elmondhatjuk, hogy az általunk azonosított 15 Li, NeLi és SeNeLi összetevő mindegyikének szennyezőktől mentes, tiszta formában, relatíve nagyobb mennyiségben (\approx 5–10 mg) való izolálása a kiválasztott optimális nyersanyagból (kezeletlen intakt egész termés, vagy annak elkülönített embrió vagy

termésfal részeiből, illetve ezek enzim- vagy savkezelt változataiból) egyszerűen megoldható preparatív HPLC módszerrel.

13. táblázat. A *Leuzea (L.) carthamoides*, *Cirsium (C.) brachycephalum (C. brach.)*, *C. vulgare*, *C. eriophorum*, *Serratula tinctoria (S. tinct.)* és *Cnicus benedictus* teljes (egész) termés és annak elkülönített embrió (embr.) és termésfal (t.fal) részeinek összetétele mg/g értékben kifejezve.

Típus	Összetevő	Kezel*	<i>L. carthamoides</i>			<i>C. brach.</i> egész	<i>S. tinct.</i> egész	<i>C. vulgare</i>			<i>C. eriophorum</i>			<i>Cnicus benedictus</i>		
			embr.	t.fal	egész			embr.	t.fal	egész	embr.	t.fal	egész	embr.	t.fal	egész
Dibenzilbutirolakton lignán	arctiin	nincs	-	-	-	-	75,4	-	-	-	-	-	-	47,5	0	23,5
		enz.-h.	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	arctigenin	nincs	-	-	-	-	6,6	-	-	-	-	-	-	0	0,38	0,18
		enz.-h.	-	-	-	-	56,0	-	-	-	-	-	-	33,5	-	-
	kartamozid	nincs	45,2	8,5	26,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		enz.-h.	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	kartamogenin	nincs	0,93	1,00	1,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
enz.-h.		31,5	6,2	18,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
trahelozid	nincs	33,0	3,91	18,1	24,4	-	20,3	0	8,7	-	-	-	-	-	-	
	enz.-h.	0	0	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	
trahelogenin	nincs	0,89	4,66	3,30	0,60	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	
	enz.-h.	24,1	7,9	15,7	17,2	-	12,6	0	5,7	-	-	-	-	-	-	
matairezínol		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,75	7,7	4,58	
Neo-lignán	balanofonin	nincs	-	-	-	-	-	0	23,2	13,0	0	11,5	6,1	-	-	-
		sav-k.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	52,7	-	-	-	-
prebalanofonin	nincs	-	-	-	-	-	-	-	-	0	45,7	22,6	-	-	-	
	sav-k.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	
Szeszkvineolignán	pikrazmalignán	nincs	-	-	-	-	-	-	-	0	1,40	0,68	-	-	-	
		sav-k.	-	-	-	-	-	-	-	-	31,0	-	-	-	-	
	prepikrazmalignán	nincs	-	-	-	-	-	-	-	0	28,8	14,0	-	-	-	
		sav-k.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	lappaol C + izolappaol C	nincs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	23,1	12,2
		sav-k.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
lappaol A + izolappaol A	nincs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	8,7	4,61	
	sav-k.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31,1	-	

* az összetételt kezeletlen (nincs) továbbá enzimhidrolizált (enz.-h.), vagy 50°C hőfokon savkezelt (sav-k.) termésmintákban határoztuk meg.

6.2. Az összetevők termésrész-specifikus felhalmozódásának jelentősége

Az összetevő típusok elkülönített felhalmozódásának az embrióban és a termésfalban nagy jelentősége van:

a) az elkülönített fal, vagy embrió kb. kétszer akkora mennyiségben tartalmazza a kiválasztott összetevőt, mint az egész termés (az egész termés mindegyik faj esetében közel 1:1 arányban áll embrió és termésfal részből), így az izolálással egyszerűbben és tisztábban nyerhető ki a kiválasztott vegyület az elkülönített termésrészekből;

b) az embrió és a termésfal tartalmaznak olyan egymáshoz közeleső retenciójú összetevőket, melyek egész termésbeli együttes előfordulása elkülönített izolálásukat megnehezíti, vagy lehetetlenné teszi preparatív HPLC módszerrel. Ilyenek

- a *Leuzea carthamoides* kartamozid és feruloil-serotonin (5.1 fejezet, 8. ábra),
- a *Cirsium vulgare* trahelogenin és balanofonin (5.3 fejezet, 16. ábra) és
- a *Cnicus benedictus* arctiin és lappaol/izolappaol C (5.5 fejezet, 26. ábra) összetevői (mindhárom fajnál az első összetevő az embrióban, a második pedig a magban fordul elő).

Ezeknél a terméseknél tehát a kartamozid, trahelogenin és arctiin az elkülönített embrióból, míg a feruloil-serotonin, balanofonin és lappaol/izolappaol C a termésfalból izolálható tiszta formában.

6.3. Az enzim- és a savkezelések eredményének jelentősége az összetevők minőségi és mennyiségi meghatározásában és izolálásában

A kezeletlen és kezelt mintákban lévő összetevő párok (glikozid/aglikon párok és diol/dihidrobenzofurán párok)

1.) kémiai jellemzőinek (HPLC-MS és GC-MS módszerekkel nyert molekulatömeg és fragmentációs adatok, UV, CD és NMR spektroszkópiás eredmények) összehasonlítása a szerkezetbizonyításuk során (5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5 fejezet) nélkülözhetetlen adatokat szolgáltatott;

2.) mennyiségi adatainak összehasonlítása a kvantitatív méréseink pontosságának bizonyításán túl pedig az azonosításukban is nélkülözhetetlen volt: a kezelt (enzimmel vagy savval) mintában megemelkedett mennyiségű (a kezeletlennel összehasonlítva), kérdéses összetevő azzal a vegyülettel áll párban (glikozid/aglikon vagy diol/dihidrobenzofurán), melynek a mennyisége a kezelés eredményeképpen pontosan annyival csökkent, mint amennyivel a kérdéses összetevőé megnőtt. Így pl. a kezeletlen intakt és enzimhidrolizált minták összetételének összehasonlításakor megállapíthatjuk, hogy

- a *Leuzea carthamoides* embrió mintáknál (8.B és 8.E ábra) a keletkezett trahelogenin (5) és arctigenin (6) mennyisége $(6,2 - 0,23 = 5,97 \text{ mmol/100 g})$ és $(8,5 - 0,25 = 8,25 \text{ mmol/100 g})$ megfelel a trahelozid (1) és trahelogenin (2) elbomlott mennyiségének $(6,0 \text{ mmol/100 g})$ és $(8,5 \text{ mmol/100 g})$;

- a *Cirsium vulgare* embrió mintáknál (8. táblázat) a keletkezett trahlogenin mennyisége (3,25 mmol/100 g) megfelel a trahelozid elbomlott mennyiségének (3,40 mmol/100g);
- a *Cirsium brachycephalum* egész termés mintáiban (14. ábra) a keletkezett trahlogenin (2) mennyisége ($44,3 - 1,53 = 42,8 \mu\text{mol/g}$) megfelel a trahelozid (1) elbomlott mennyiségének (44,4 $\mu\text{mol/g}$);
- a *Serratula tinctoria* egész termés mintáiban (15. ábra) a keletkezett arctigenin (4) mennyisége ($150,5 - 17,7 = 132,8 \mu\text{mol/g}$) megfelel az arctiin (1) elbomlott mennyiségének (141,2 $\mu\text{mol/g}$).

A kezeletlen intakt és savkezelt (50°C hőmérsékleten) minták összetételének összehasonlításakor megállapíthatjuk, hogy

- a *Cnicus benedictus* termésfal mintáiban (13. táblázat) a keletkezett lappaol A + izolappaol A össz mennyisége ($31,1 - 8,7 = 22,4 \text{ mg/g}$) megfelel a lappaol C + izolappaol C (23,1 mg/g) elbomlott mennyiségének, valamint
- a *Cirsium eriophorum* termésfal mintáiban (13. táblázat) a keletkezett balanofonin ($52,7 - 11,5 = 41,2 \text{ mg/g}$) és pikrazmalignán ($31,0 - 1,40 = 29,6 \text{ mg/g}$) megfelel a prebalanofonin (45,7 mg/g) és prepikrazmalignán (28,8 mg/g) elbomlott mennyiségének (az átalakulás időbeli lezajlása a 23. ábrán mmol/100g-ban kifejezve látható).

(Megjegyzés: A glikozid/aglikon párok molekulatömege közötti jelentős különbség miatt az átalakulásaik mennyiségi viszonyainak követhetősége érdekében a koncentrációértékeiket anyagmennyiségben (mmol/100g vagy $\mu\text{mol/g}$) adtuk meg, míg a diol/dihidrobzofurán párok molekulatömege közötti kis különbség (18 Da) miatt a mg/g értékek is összehasonlíthatók.)

7. Következtetések

7.1. Termésrészek és kezelések

A vizsgált termések, termésrészek (embrió és termésfal) intakt és enzim-, vagy savkezelt változatainak összetételét vizsgálva megállapíthatjuk, hogy

- 1.) a DBBL Li összetevők nagyobb mennyiségben glikozidjaik formájában (arctiin, trahelozid és kartamozid) fordulnak elő,
- 2.) a DBBL Li glikozidok specifikus felhalmozódási helye a termés embrió része,
- 3.) az embrióban lévő DBBL Li glikozidok az embrióban ugyancsak jelenlévő glikozidáz enzimek segítségével a nekik megfelelő aglikon molekulákká hidrolizálnak,
- 4.) így a DBBL Li aglikonok legnagyobb mennyiségben az enzimhidrolizált embrióban található meg,
- 5.) a NeLi és SeNeLi összetevők csak aglikon formában, kizárólag a termésfal összetevőiként fordulnak elő,
- 6.) a NeLi és SeNeLi összetevők savas közegben való viselkedésük alapján párokba rendezhetők, mivel a nyílt láncú, diol szerkezetű részük savban melegítve H₂O kilépéssel dihidrobenzofurán gyűrűrendszert képez. Így a diol/dihidrobenzofurán párok a prebalanofonin/balanofonin, prepikrazmalignán/pikrazmalignán, lappaol C/lappaol A és izolappaol C/izolappaol A,
- 7.) a diol/dihidrobenzofurán párok egy termésben egymás mellett előfordulnak a diol szerkezetűek dominanciájával [kivétel a *C. vulgare*, ahol a pár dihidrobenzofurán tagja (balanofonin) került csak azonosításra diol párja (prebalanofonin) nélkül (eddig)],
- 8.) a termésfalban lévő NeLi és SeNeLi összetevők diol szerkezetű képviselői (prebalanofonin, prepikrazmalignán, lappaol C és izolappaol C) savkezeléssel teljes mértékben a nekik megfelelő dihidrobenzofurán szerkezetű párjukká (balanofonin, pikrazmalignán, lappaol A és izolappaol A) alakíthatók.

A *Cirsium vulgare* termésében a diol/dihidrobenzofurán párból csak a dihidrobenzofurán balanofonin került azonosításra. A 6-8. pontok alapján azonban ebben a fajban is várható a balanofonin diol párjának, a prebalanofonin molekulának a jelenléte, amit jelenleg is zajló vizsgálataink megerősíteni látszanak (a *C. vulgare* terméskivonatának kromatogramjain lévő x₃ csúcs lehet ez (16. ábra).

7.2. Daganatgátló hatások

A rendelkezésünkre álló, általunk izolált összetevők hatásvizsgálata során a DBBL Li aglikon formák (arctigenin, kartamogenin és trahelogenin) daganatgátló (sejtosztódást gátló) hatását és ennek mechanizmusát tanulmányoztuk SW480 vastagbél-daganat-sejtvonalon. Eredményeink először bizonyítják

- 1.) a kartamogenin daganatgátló (antiproliferatív) hatását,
- 2.) a trahelogenin antiproliferatív hatását SW480 sejtek ellen,
- 3.) a trahelogenin antiproliferatív hatásmechanizmusát: a daganatsejtek osztódásfokozó fehérjéinek (β -katenin, c-Myc) gátlását és az osztódásgátló GSK3 fehérje aktiválását, továbbá sokmagvú óriássejt-képzést és apoptózist fokozó, valamint tubulusgátló tulajdonságát, és
- 4.) az arctigenin hatásmechanizmusát: a trahelogenin esetén ismertetett folyamatokkal azonos jellegű hatásait a c-Myc és GSK3 fehérjékre, valamint a mikrotubuláris rendszerre.

Az általunk izolált többi összetevő ilyen jellegű hatásának vizsgálata azok daganatgátló jelentőségét is bizonyíthatja.

8. Összefoglalás

Doktori munkám során lignán (Li), neolignán (NeLi) és szeszkvineolignán (SeNeLi) típusú növényi anyagcseretermékeket tanulmányoztunk kémiai és hatástani szempontból a bogáncs nemzetségcsoport kiválasztott fajainak termésében.

1.) Első alkalommal határoztuk meg a *Cirsium eriophorum*, *C. brachycephalum*, *C. vulgare* (gyapjas-, kislefű- és közönséges aszat) és *Serratula tinctoria* (festő zsoltina) termések összetételét, továbbá a *Cnicus benedictus* (benedekfű) és *Leuzea carthamoides* termésekben már ismert összetevők mennyiségét – a benedekfű esetében még nem azonosított anyagcseretermékeket is kimutattunk.

2.) Vizsgálataink során két új természetes vegyület (a NeLi prebalanophonin és a SeNeLi prepikrazmalignán) szerkezetbizonyítása mellett 13 ismert összetevő (a Li-ok csoportjából a dibenzilbutirolakton szerkezetű arctiin, arctigenin, kartamozid, kartamogenin, matairezinol, trahelozid, trahelogenin; a SeNeLi-ok közül lappaol A és C, izolappaol A és C, illetve pikrazmalignán; valamint a NeLi balanofonin) új forrásait azonosítottuk.

3.) A elkülönült embrió és termésfal részek összetételének vizsgálata az összetevők termésrész-specifikus felhalmozódását bizonyította.

4.) Az összetevők átalakítására módszereket optimalizáltunk, és megállapítottuk, hogy:

4.1.) a termésfalban lévő NeLi és SeNeLi összetevők diol szerkezetű képviselői (prebalanofonin, prepikrazmalignán, lappaol C és izolappaol C) 50°C hőmérsékleten végzett savkezeléssel teljes mértékben a nekik megfelelő dihidrobenzofurán szerkezetű párjukká (balanofonin, pikrazmalignán, lappaol A és izolappaol A) alakíthatók;

4.2.) az embrió dibenzilbutirolakton Li glikozid összetevői enzimikus hidrolízissel teljes mértékben a megfelelő aglikon molekulává alakíthatók.

5.) A 3. és 4. pontban leírt eredmények lehetővé tették az izolálást megnehezítő szennyezőktől mentes termésminta (enzim-, vagy savkezelt embrió vagy termésfal) előállítását a kiválasztott összetevő izolálásához.

6.) Bizonyítottuk az izolált arctigenin, kartamogenin és trahelogenin SW480 vastagbél-daganatsejtek elleni hatását és hatásmechanizmusát: a daganatsejtek osztódást fokozó fehérjéinek (β -katenin, c-Myc) gátlását és az osztódásgátló GSK3 fehérje aktiválását, továbbá sokmagvú óriássejt-képzést és apoptózist fokozó valamint tubulus-gátló tulajdonságát.

9. Summary

During my PhD work lignan (Li), neolignan (NeLi) and sesqueneolignan (SeNeLi) type plant metabolites were studied in a chemical and pharmacological point of view, in the fruits of selected species belonging to the thistle tribe.

1.) The composition of fruits of *Cirsium eriophorum* (woolly thistle), *C. brachycephalum*, *C. vulgare* (spear thistle) and *Serratula tinctoria* (saw-wort) was determined for the first time, and, beside quantifying the already known compounds of *Cnicus benedictus* (blessed thistle) and *Leuzea carthamoides*, in blessed thistle yet unidentified metabolites were also detected.

2.) Beside the characterization of two new natural products (NeLi prebalanophonin and SeNeLi prepicrasmalignan), new sources of 13 known molecules (the dibenzylbutyrolactone structure arctiin, arctigenin, carthamoside, carthamogenin, matairesinol, tracheloside, trachelogenin; the SeNeLi lappaol A and C, isolappaol A and C, picrasmalignan; and the NeLi balanophonin) have been identified.

3.) Examining the composition of the separated embryo and pericarp sections, specific accumulation of ingredients was shown.

4.) For converting the components several methods were optimized:

4.1.) With acid treatment on 50°C temperature of diol-structure NeLi and SeNeLi ingredients of the fruit wall (prebalanophonin, prepicrasmalignan, lappaol C and isolappaol C) can be converted quantitatively into their dihydrobenzofuran structure pair (balanophonin, picrasmalignan, lappaol A and isolappaol A).

4.2.) dibenzylbutyrolactone Li glycoside components of the embryo can be quantitatively converted into their corresponding aglycone molecules by enzymatic hydrolysis.

5.) The results of 3. and 4. has enabled the preparation of fruit samples (enzyme or acid-treated embryo or pericarp) free of contaminants (which hinder the isolation).

6.) Antiproliferative effect of the isolated arctigenin, carthamogenin and trachelogenin on SW480 colon adenocarcinoma cell-line, and the mechanism of action have been proved: inhibition of cell proliferation-enhancing proteins (β -catenin, c-Myc), activation of the proliferation-inhibiting GSK3 protein. In addition, properties like enhancing of multinucleated giant cell formation and apoptosis, and anti-tubular efficiency were also demonstrated.

10. Irodalomjegyzék

- [1] Lewis NG, Sarkanen S. Lignin and Lignan Biosynthesis. American Chemical Society, Washington, 1996.
- [2] Ghisalberti EL. (1997) Cardiovascular activity of naturally occurring lignans. *Phytomedicine*, 4: 151–166.
- [3] Cabral MMO, Kelecom A, Garcia ES. (1999) Effects of the lignan, pinoresinol on the moulting cycle of the bloodsucking bug *Rhodnius prolixus* and of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. *Fitoterapia*, 70: 561–567.
- [4] Moss JP. (2000) Nomenclature of Lignans and Neolignans (IUPAC Recommendations 2000). *Pure Appl Chem*, 72: 1493–1523.
- [5] Cunha WR, Luis M, Sola RC, Ambrósio SR, Bastos JK, Franca D. Lignans: Chemical and Biological Properties. In: Rao V (szerk.), *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. InTech, 2012: 213–234.
- [6] Umezawa T. (2003) Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochem Rev*, 2: 371–390.
- [7] Haruna M, Koube T, Ito K, Murata H. (1982) Balanophonin, a new neolignan from *Balanophora japonica* Makino. *Chem Pharm Bull*, 30:1525–1527.
- [8] Ito A, Kasai R, Yamasaki K, Minh Duc N, Thoi Nham N. (1994) Lignan glycosides from bark of *Albizia myriophylla*. *Phytochemistry*, 37: 1455–1458.
- [9] Abe F, Yamauchi T. (1989) Lignan glycosides from *Parsonsia laevigata*. *Phytochemistry*, 28: 1737–1741.
- [10] Davin LB, Wang HB, Crowell AL, Bedgar DL, Martin DM, Sarkanen S, Lewis, NG. (1997) Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science*, 275: 362–366.

- [11] Davin LB, Lewis NG. (2000) Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiol*, 123: 453–462.
- [12] Dinkova-Kostova AT, Gang DR, Davin LB, Bedgar DL, Chu A, Lewis NG. (1996) (+)-Pinoresinol/(+)-Lariciresinol Reductase from *Forsythia intermedia*. *J Biol Chem*, 271: 29473–29482.
- [13] Rahman MMA, Dewick PM, Jackson DE, Lucas JA. (1990) Production of Lignans in *Forsythia* Cultures. *Phytochemistry*, 29: 1861–1866.
- [14] Kasahara H, Jiao Y, Bedgar DL, Kim S-J, Patten AM, Xia Z-Q, Davin LB, Lewis NG. (2006) *Pinus taeda* phenylpropanal double-bond reductase: purification, cDNA cloning, heterologous expression in *Escherichia coli*, and subcellular localization in *P. taeda*. *Phytochemistry*, 67: 1765–1780.
- [15] Sharples D, Stoker JR. (1969) The identification and biosynthesis of two cyanogenic glycosides in *Thalictrum aquilegifolium*. *Phytochemistry*, 8: 597–601.
- [16] Boldizsár I, Kraszni M, Tóth F, Noszál B, Molnár-Perl I. (2010) Complementary fragmentation pattern analysis by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry confirmed the precious lignan content of *Cirsium* weeds. *J Chromatogr A*, 1217: 6281–6289.
- [17] Boldizsár I, Füzfaí Z, Tóth F, Sedlák É, Borsodi L, Molnár-Perl I. (2010) Mass fragmentation study of the trimethylsilyl derivatives of arctiin, matairesinoside, arctigenin, phylligenin, matairesinol, pinoresinol and methylarctigenin: Their gas and liquid chromatographic analysis in plant extracts. *J Chromatogr A*, 1217: 1674–1682.
- [18] Ayres CD, Loike JD. *Lignans- Chemical, biological and clinical properties*. Cambridge University Press, New York: 1990.

- [19] Li G, Li X, Cao L, Shen L, Zhu J, Zhang J, Wang J, Zhang L, Si J. (2014) Steroidal esters from *Ferula sinkiangensis*. *Fitoterapia*, 97: 247–252.
- [20] Elfahmi NV, Ruslan K, Batterman S, Bos R, Kayser O, Woerdenbag HJ, Quax WJ. (2007) Lignan profile of *Piper cubeba*, an Indonesian medicinal plant. *Biochem Syst Ecol*, 35: 397–402.
- [21] Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, Tyag OD, Prasad AK, Wengel J, Olsen CE, Boll PM. (1997) Phytochemistry of the Genus *Piper*. *Phytochemistry*, 46: 597–673.
- [22] Yoo H, Park J, Kwon S. (2006) An Antiestrogenic Lignan Glycoside, Tracheloside, from Seeds of *Carthamus tinctorius*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70: 2783–2785.
- [23] Kuehnl S, Schroecksnadel S, Temml V, Gostner JM, Schennach H, Schuster D, Schwaiger S, Rollinger J, Fuchs D, Stuppner H. (2013) Lignans from *Carthamus tinctorius* suppress tryptophan breakdown via indoleamine 2,3-dioxygenase. *Phytomedicine*, 20: 1190–1195.
- [24] Zhu C, Jing L, Yu N, Yang X, Zhao Y. (2013) A new lignan and active compounds inhibiting NF- κ B signaling pathway from *Caulis Trachelospermi*. *Acta Pharm Sin B*, 3: 109–112.
- [25] Chen Y, Fu WW, Sun LX, Wang Q, Qi W, Yu H. (2009) A new coumarin from *Wikstroemia indica* (L.) C. A. Mey. *Chinese Chem Lett*, 20: 592–594.
- [26] Jang YP, Kim SR KY. (2001) Neuroprotective dibenzylbutyrolactone lignans of *Torreya nucifera*. *Planta Med*, 67: 470–472.
- [27] Lee IA, Joh E, Kim DH. (2011) Arctigenin isolated from the seeds of *Arctium lappa* ameliorates memory deficits in mice. *Planta Med*, 77: 1525–1527.

- [28] Shi YN, Shi YM, Yang L, Li XC, Zhao JH, Qu Y, Zhu HT, Wang D, Cheng RR, Yang CR, Xu M, Zhang YJ. (2015) Lignans and aromatic glycosides from *Piper wallichii* and their antithrombotic activities. *J Ethnopharmacol*, 162: 87–96.
- [29] Kitamura Y, Yamagishi M, Okazaki K, Son H-Y, Imazawa T, Nishikawa A, Iwata T, Yamauchi Y, Masaaki K, Tsutsumi K, Masao, H. (2003) Lack of significant inhibitory effects of a plant lignan tracheloside on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced mammary carcinogenesis in female Sprague–Dawley rats. *Cancer Lett*, 200: 133–139.
- [30] Kang K, Lee H, Kim C, Lee S, Tunsag J, Batsuren D. (2007) The chemopreventive effects of *Saussurea salicifolia* through induction of apoptosis and phase II detoxification enzyme. *Biol Pharm Bull*, 30: 2352–2359.
- [31] Gu Y, Qi C, Sun X, Ma X, Zhang H, Hu L, Yuan J, Yu Q. (2012) Arctigenin preferentially induces tumor cell death under glucose deprivation by inhibiting cellular energy metabolism. *Biochem Pharmacol*, 84: 468–476.
- [32] Susanti S, Iwasaki H, Inafuku M, Taira N, Oku H. (2013) Mechanism of arctigenin-mediated specific cytotoxicity against human lung adenocarcinoma cell lines. *Phytomedicine*, 21: 39–46.
- [33] Hsieh CJ, Kuo PL, Hsu YC, Huang YF, Tsai EM, Hsu YL. (2014) Arctigenin, a dietary phytoestrogen, induces apoptosis of estrogen receptor-negative breast cancer cells through the ROS/p38 MAPK pathway and epigenetic regulation. *Free Radic Biol Med*, 67: 159–170.
- [34] Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ, Koo JS. (2011) Arctigenin induces cell cycle arrest by blocking the phosphorylation of Rb via the modulation of cell cycle regulatory proteins in human gastric cancer cells. *Int Immunopharmacol*, 11: 1573–1577.
- [35] Su S, Cheng X, Wink M. (2015) Natural lignans from *Arctium lappa* modulate P-glycoprotein efflux function in multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine*, 22: 301–307.

- [36] Yoo JH, Lee HJ, Kang K, Jho EH, Kim CY, Baturen D, Tunsag J, Nho CW. (2010) Lignans inhibit cell growth via regulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Food Chem Toxicol*, 48: 2247–2252.
- [37] Matsumoto T, Hosono-Nishiyama K, Yamada H. (2006) Antiproliferative and apoptotic effects of butyrolactone lignans from *Arctium lappa* on leukemic cells. *Planta Med*, 72: 276–278.
- [38] Schmidt E. (1999) The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene*, 18: 2988–2996.
- [39] Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR. (2000) Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev*, 14: 2501–2514.
- [40] Doble BW, Woodgett JR. (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*, 116: 1175–1186.
- [41] Minde D. (2011) Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? *Mol Cancer*, 10: 101.
- [42] Pulverer BJ. (1994) Site-specific modulation of c-Myc cotransformation by residues phosphorylated in vivo. *Oncogene*, 9: 59–70.
- [43] Horbay R, Stoika R. (2011) Giant cell formation: the way to cell death or cell survival? *Cent Eur J Biol*, 6: 675–684.
- [44] Sackett DL. (1993) Podophyllotoxin, steganacin and combretastain: Natural products that bind at the colchicine site of tubulin. *Pharmacol Ther*, 59: 163–228.
- [45] Eich E, Pertz H, Kaloga M, Schulz J, Fesen MR, Mazumder A, Pommier Y. (1996) (–)-Arctigenin as a Lead Structure for Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Integrase. *J Med Chem*, 39: 86–95.
- [46] Yang Z, Liu N, Huang B, Wang Y, Hu Y, Zhu Y. (2005) Effect of anti-influenza virus of Arctigenin in vivo. *J Chinese Med Mater*, 28: 1012–1014.

- [47] Kuo Y-C, Kuo Y-H, Lin Y-L, Tsai W-J. (2006) Yatein from *Chamaecyparis obtusa* suppresses herpes simplex virus type 1 replication in HeLa cells by interruption the immediate-early gene expression. *Antiviral Res*, 70: 112–120.
- [48] Schröder HC, Merz M, Steffen R, Müller WEG, Sarin PS, Trumm S, Schulz J, Eich E. (1990) Differential in vitro anti-H IV activity of natural lignans. *Z Naturforsch*, 45c: 1215–1221.
- [49] Landete JM. (2012) Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Res Int*, 46: 410–424.
- [50] Adlercreutz H, Mousavi Y, Clark J, Höckerstedt K, Hämäläinen E, Wähälä K, Mäkelä T, Hase T. (1992) Dietary phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo studies. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 41: 331–337.
- [51] Ming DS, Guns E, Eberding A, Towersa GH. (2004) Isolation and Characterization of Compounds with Anti-prostate Cancer Activity from *Arctium lappa* L. Using Bioactivity-guided Fractionation. *Pharm Biol*; 42: 44–48.
- [52] Umehara K, Sugawa A, Kurozanagi M, Ueno A, Taki T. (1993) Studies on differentiation inducers from *Arctium fructus*. *Chem Pharm Bull*, 41: 1774–1779.
- [53] Shoeb M, Rahman M., Nahar L, Jaspars M, MacManus S, Delazar A, Sarker SD. (2004) Bioactive lignans from the seeds of *Centaurea macrocephala*. *DARU*, 12: 87–93.
- [54] Falah S, Suzuki T, Katayama T. (2008) Chemical constituents from *Swietenia macrophylla* bark and their antioxidant activity. *J Wood Sci*, 11: 2007–2012.
- [55] Kang HS, Lee JY, Kim CJ. (2008) Anti-inflammatory activity of arctigenin from *Forsythiae Fructus*. *J Ethnopharmacol*, 116: 305–312.
- [56] Wang QH, Peng K, Tan LH, Dai HF. (2010) Aquilarin A, a new benzenoid derivative from the fresh stem of *Aquilaria sinensis*. *Molecules*, 15: 4011–4016.

- [57] Nakashima S, Matsuda H, Oda Y, Nakamura S, Xu F, Yoshikawa M. (2010) Melanogenesis inhibitors from the desert plant *Anastatica hierochuntica* in B16 melanoma cells. *Bioorg Med Chem*, 18: 2337–2345.
- [58] Szokol-Borsodi L, Sólyomváry A, Molnár-Perl I, Boldizsár I. (2012) Optimum yields of dibenzylbutyrolactone-type lignans from cynareae fruits, during their ripening, germination and enzymatic hydrolysis processes, determined by on-line chromatographic methods. *Phytochem Anal*, 23: 598–603.
- [59] Bardon A, Montanaro S, Catalan C a N, Diaz JG, Herz W. (1993) Piptocarphols and other constituents of *Chrysolea verbascifolia* and *Lessingianthus rubricaulis*. *Sect Title Plant Biochem*, 34: 253–259.
- [60] Sy LK, Brown GD. (1999) Coniferaldehyde derivatives from tissue culture of *Artemisia annua* and *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry*, 50: 781–785.
- [61] Lee DY, Song MC, Yoo KH, Bang MH, Chung IS, Kim SH, Kim DK, Kwon BM, Jeong TS, Park MH, Baek NI. (2007) Lignans from the fruits of *Cornus kousa* Burg. and their cytotoxic effects on human cancer cell lines. *Arch Pharm Res*, 30: 402–407.
- [62] Liu J, Cai Y-Z, Wong RNS, Lee CK-F, Tang SCW, Sze SCW, Tong Y, Zhang Y. (2012) Comparative Analysis of Caffeoylquinic Acids and Lignans in Roots and Seeds among Various Burdock (*Arctium lappa*) Genotypes with High Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem*, 60: 4067–4075.
- [63] Park SY, Hong SS, Han XH, Hwang JS, Lee D, Ro JS, Bang YH. (2007) Lignans from *Arctium lappa* and their inhibition of LPS-induced nitric oxide production. *Chem Pharm Bull*, 55: 150–152.
- [64] Ichihara A, Numata Y, Kanai S, Sakamura S. (1977) New Sesquilignans from *Arctium lappa* L. The Structure of Lappaol C, D and E. *Agric Biol Chem*, 41: 1813–1814.

- [65] Shoeb M, MacManus SM, Kumarasamy Y, Jaspars M, Nahar L, Thoo-Lin PK, Nazemiyeh H, Sarker SD. (2006) Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*. *Phytochemistry*, 67: 2370–2375.
- [66] Bruno M, Fazio C, Paternostro MP, Diaz JG, Herz W. (1995) Sesquiterpene Lactones and other Constituents of *Centaurea napifolia*. *Planta Med*, 61: 374–5.
- [67] Bruno M, Paternostro MP, Gedris TE, Herz W. (1996) Sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea nicaensis*. *Phytochemistry*, 41: 335–336.
- [68] Bastos MMSM, Kijjoa A, Cardoso JM, Gutiérrez AB, Herz W. (1990) Lignans and Other Constituents of *Centaurea sphaerocephala* ssp. *polyacantha*. *Planta Med*, 56: 403–405.
- [69] Jiao WH, Gao H, Zhao F, He F, Zhou GX, Yao XS. (2011) New Neolignan and a New Sesterterpenoid from the Stems of *Picrasma quassioides* Bennet. *Chem Biodivers*, 8: 1163–1169.
- [70] Jordon-Thaden IE, Louda SM. (2003) Chemistry of *Cirsium* and *Carduus*: A role in ecological risk assessment for biological control of weeds? *Biochem Syst Ecol*, 31: 1353–1396.
- [71] Lech K, Witkoś K, Jarosz M. (2014) HPLC-UV-ESI MS/MS identification of the color constituents of sawwort (*Serratula tinctoria* L.). *Anal Bioanal Chem*, 406: 3703–3708.
- [72] Kokoska L, Janovska D. (2009) Chemistry and pharmacology of *Rhaponticum carthamoides*: A review. *Phytochemistry*, 70: 842–855.
- [73] Harmatha J, Buděšínský M, Vokáč K, Pavlí M, Grüner K, Laudová V. (2007) Lignan glucosides and serotonin phenylpropanoids from the seeds of *Leuzea carthamoides*. *Collect Czechoslov Chem Commun*, 72: 334–346.
- [74] Pelikan W. *The Compositae*. (1978) *Br Homeopath J*, 67: 132–143.

- [75] Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastré R. (1975) Lactonic lignans from *Cnicus benedictus*. *Phytochemistry*, 14: 2709.
- [76] Tóth G, Alberti Á, Sólyomváry A, Barabás C, Boldizsár I, Noszál B. (2015) Phenolic profiling of various olive bark-types and leaves: HPLC–ESI/MS study. *Ind Crops Prod*, 67: 432–438.
- [77] Rahman MMA, Dewick PM, Jackson DE, Lucas JA. (1990) Biosynthesis of lignans in *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry*, 29: 1841–1846.
- [78] Yuen MSM, Xue F, Mak TCW, Wong HNC. (1998) On the absolute structure of optically active Neolignans containing a dihydrobenzo[b]furan Skeleton. *Tetrahedron*, 54: 12429–12444.

11. A szerző publikációinak jegyzéke**Az értekezés témájában megjelent közlemények**

[S1] Boldizsár I, Kraszni M, Tóth F, Tóth G, Sólyomváry A, Noszál B, Záray Gy, Molnár-Perl I. (2012) The role of harmonized, gas and liquid chromatography mass spectrometry in the discovery of the neolignan balanophonin in the fruit wall of *Cirsium vulgare*. J Chromatogr A, 1264: 143–147.

[S2] Sólyomváry A, Tóth G, Kraszni M, Noszál B, Molnár-Perl I, Boldizsár I. (2014) Identification and quantification of lignans and sesquilignans in the fruits of *Cnicus benedictus* L.: Quantitative chromatographic and spectroscopic approaches. Microchem J, 114: 238–246.

[S3] Sólyomváry A, Mervai Zs, Molnár-Perl I, Boldizsár I. (2014) Specific hydrolysis and accumulation of antiproliferative lignans in the fruit of *Leuzea carthamoides* (Willd.) DC. Nat Prod Res, 28: 732–739.

[S4] Sólyomváry A, Tóth G, Komjáti B, Horváth P, Kraszni M, Noszál B, Molnár-Perl I, Boldizsár I. (2015) Identification and isolation of new neolignan and sesquineolignanspecies: Their acid-catalyzed ring closure and specific accumulation in the fruit wall of *Cirsium eriophorum* (L.) Scop. Process Biochem 50, 5: 853–858.

[S5] Mervai Zs, Sólyomváry A, Tóth G, Noszál B, Molnár-Perl I, Baghy K, Kovalszky I, Boldizsár I. (2015) Endogenous enzyme-hydrolyzed fruit of *Cirsium brachycephalum*: Optimal source of the antiproliferative lignan trachelogenin regulating the Wnt/ β -Catenin signaling pathway in the SW480 colon adenocarcinoma cell line. Fitoterapia, 100: 19–26.

[S6] Sólyomváry A, Mervai Zs, Tóth G, Evelin Rész Á, Noszál B, Molnár-Perl I, Baghy K, Kovalszky I, Boldizsár I. (2015) A simple and effective enrichment process of the antiproliferative lignan arctigenin based on the endogenous enzymatic hydrolysis of *Serratula tinctoria* and *Arctium lappa* fruits. Process Biochem, 50, 12: 2282–2288.

A disszertációtól független publikációk

Szokol-Borsodi L, Sólyomváry A, Molnár-Perl I, Boldizsár I. (2012) Optimum Yields of Dibenzylbutyrolactone-type Lignans from Cynareae Fruits, During their Ripening, Germination and Enzymatic Hydrolysis Processes, Determined by On-line Chromatographic Methods. *Phytochem Analysis*, 23: 598–603.

Tóth G, Sólyomváry A, Boldizsár I, Noszál B. (2014) Characterization of enzyme-catalysed endogenous-hydroxylation of phenylethanoid glycosides in *Euphrasia rostkoviana* Hayne at the molecular level. *Process Biochem* 49, 9: 1533–1537.

Tóth G, Alberti Á, Sólyomváry A, Barabás Cs, Boldizsár I, Noszál B. (2015) Phenolic profiling of various olive bark-types and leaves: HPLC–ESI/MS study. *Ind Crop and Prod*, 67: 432–438.

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Böddi Béla tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette doktori munkám elvégzését az ELTE Növény szerzettani Tanszéken. Köszönettel tartozom Dr. Dános Béla egyetemi tanárnak a sok segítségért, és a Leuzea termékek rendelkezésemre bocsátásáért. Köszönöm a Növény szerzettani Tanszék minden munkatársának, hogy szakmai és emberi támogatásukkal segítették munkámat.

Köszönöm Perlné Dr. Molnár Ibolya professzor asszonynak és Molnár Borbála PhD hallgatónak a GC-MS mérések lehetővé tételét.

Dr. Tóth Gergő egyetemi tanársegédnek és Komjáti Balázs PhD hallgatónak szeretném megköszönni az analitikai munkában (LC-MS, NMR, CD spektroszkópia) nyújtott segítségét.

Dr. Kovalszky Ilona professzor asszonynak, Dr. Baghy Kornélia tudományos munkatársnak és Dr. Mervai Zsolt PhD hallgatónak szeretném megköszönni az együttműködést; a hatástani vizsgálatok eredményei nekik köszönhetőek.

Végül, de nem utolsó sorban hálámat fejezem ki Dr. Boldizsár Imre egyetemi adjunktusnak, hogy témavezetőként irányította munkámat, ellátott ötletekkel a kísérletek során, és az elméleti és gyakorlati problémák megoldásában mindig készséggel segítségemre volt.