

Kemodiverzitás a *Cardueae* és *Anthriscus* rokonsági körökben: az intakt szövetek és *in vitro* kultúráik növénykémiai vizsgálata

Doktori tézisek

Könye Rita

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Béni Szabolcs, Ph.D.
Dr. Boldizsár Imre, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Horváth Györgyi, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Dunkel Petra, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Klebovich Imre, egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hajdú Zsuzsanna, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Halász Júlia, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Lemberkovics Éva, egyetemi tanár, Ph.D.

Budapest
2020

1 BEVEZETÉS

Világszerte a daganatos betegségek a vezető halálozási okok közé tartoznak, a hatékony gyógymódjuk megtalálása kiemelt fontosságú. A növényi másodlagos anyagcseretermékek a gyógyászat számos területén felhasználásra kerülnek, kiemelkedő a szerepük a különféle daganatos folyamatok kezelésében. Ilyen céllal kerül felhasználásra a lignánok csoportjába tartozó podofillotoxin (és félszintetikus származéka, pl. az etoposide és a teniposide). A növényi másodlagos anyagcsere összetettsége, a vegyületei rendkívüli változatossága miatt azonban várható további új, értékes, daganatellenes hatású természetes összetevők azonosítása.

A lignánok fenilpropán egységekből felépülő, változatos szerkezetű másodlagos anyagcseretermékek csoportja. A daganatos folyamatok gátlása mellett (pl. podofillotoxin), számos élettani hatásuk is ismert (pl. gyulladásgátló és antivirális hatásait vizsgálják). Kinyerésük a növényekből ugyanakkor problémát jelent: nem halmozódnak fel elegendő mennyiségben, a növények termesztése pedig nem megoldott.

A különböző sejt- és szövettenyészetek nyújthatnak megoldást a terápiás jelentőséggel bíró vegyületek költséghatékony termeltetésére. Kutatócsoportunk korábban az Asteraceae család Cardueae (bogáncsok) nemzetségcsoportjának több fajtát vizsgálta. Az ide tartozó fajok terméseiben - nagy mennyiségben jelen lévő - dibenzilbutirolakton és furofurán típusú lignánokat írt le. Az előzetes vizsgálatok rámutattak arra, hogy a *Cirsium* fajok (*C. arvense*, *C. boujartii*, *C. brychycephalum*, *C. canum*, *C. eriophorum*, *C. oleraceum*, *C. palustre*, *C. rivulare* és *C. vulgare*), a *Jurinea mollis* és a *Carduus nutans* terméseit további, ismert és még nem azonosított, új dibenzilbutirolakton és furofurán lignánokat tartalmazhatnak. Ezen felül az ariltetralin típusú lignánokat (podofillotoxin és származékai) földbeni szerveiben felhalmozó *Anthriscus sylvestris* (erdei turbolya) hajtása, a közeli rokon fajaiéval egyben (*A. cerefolium*, és *A. caucalis*) szintén értékes anyagcseretermékek forrásai lehetnek, akár csak az *in vitro* szövetkultúráik..

2 CÉLKITŰZÉS

Munkánk során célunk volt a kevésbé kutatott, *Cardueae* nemzetségcsoportba (Asteraceae család) tartozó fajok terméseit vizsgálni, melyek potenciálisan lignánokat halmoznak fel.

1. A *Jurinea mollis* terméseit felhasználva terveztünk kidolgozni egy enzimátikus hidrolízisre épülő eljárást, mellyel arktigenint (aglikon) tudunk előállítani.
2. A *Carduus nutans* terméseit terveztük vizsgálni azok lignántartalmának meghatározása érdekében.
3. *Cirsium* fajok terméseinek részletes fitokémiai vizsgálatát terveztük, a Magyarországon honos *Cirsium* fajokban felhalmozódó lignánok, neolignánok és szeszkvineolignánok kemotaxonómiai jelentőségének értékelésével. Célunk volt továbbá az egyes vegyületek szennyezésmentes izolálására optimális források meghatározása.

Az *Anthriscus sylvestris* földbeni szerveinek lignánfelhalmozó képessége miatt terveztük:

4. az elérhető magyarországi *Anthriscus* fajok föld feletti részeinek fitokémiai profilját meghatározni.
5. Célunk volt még: *in vitro* szövettenyészetek létrehozni *Cirsium* és *Anthriscus* fajokból az általuk felhalmozott értékes vegyületek termeltetésére
6. és az izolált vegyületek jelentőségének bizonyítása.

3 MÓDSZEREK

3.1. Növényanyag

A növényanyag begyűjtése különböző magyarországi területeken történt. Az alábbi mintákat gyűjtöttük be a különböző fajokból:

- érett termés: *Cirsium arvense*, *C. boujartii*, *C. brachycephalum*, *C. canum*, *C. eriophorum*, *C. oleraceum*, *C. palustre*, *C. rivulare*, *C. vulgare*, *Carduus nutans*, *Jurinea mollis* and *A. cerefolium*.
- éretlen és félig érett termés: *Jurinea mollis*.
- egész növény, virágzás alatt: *Anthriscus caucalis*, *A. cerefolium* and *A. sylvestris*

3.2. Kivonatok és mintaelőkészítés

Termésfal és embrió elválasztása

Jurinea mollis termés részeinek manuális szétválasztása történt: a termés embrió és termésfal részei kerültek elkülönítésre.

Enzimatikusan hidrolizált termés minták

Liofilizált és őrölt *Cirsium* termés minták (0,5 g) és *J. mollis* egész termés, embrió szövetek (75,0 mg) szuszpendálása 3 ml desztillált vízben történt. Az hidrolízist a *J. mollis* szuszpenziók esetében 5, 15, 30, 60, 300 és 900 percig szobahőmérsékleten, míg a *Cirsium* fajoknál 30 percig 40°C-on végeztük. A hidrolízist követően a mintákat liofilizáltuk és az alábbi módszerrel extraháltuk:

Kivonat készítés

Minden esetben, liofilizált, őrölt mintákkal dolgoztunk. *Cirsium* termések (0,5 g), *J mollis* termés(részek) (75 mg) intakt kezeletlen és előzetesen, enzimmal hidrolizált mintáit és *Anthriscus* föld feletti részek és az *in vitro* kultúrák (20 mg) kivonatait készítettük el, 3-szor 5 ml 80% (V/V) metanollal 60°C-on, 30 perc kezelési idővel.

Carduus nutans terméseit (10 g) háromszor 100 ml metanollal extraháltuk visszafolyó-hűtő segítségével és rotációs vákuumbepárlóval (30-40 °C) szárítottuk.

Savkezelés

Cirsium kivonatokot rotációs vákuumbepárlóval (30-40°C) szárítottuk, majd 500 µL 2M töménységű trifluoecetsav oldattal kezeltük 50°C-on 15 percig. A savkezelt mintát beszárítottuk (30-40 °C) és visszaoldottuk 80%-os (V/V) metanolban.

Nagy tisztaságú arktigenin extraktum (NTAE) *J. mollis* terméseiből

200 mg termés és embrió szövetet háromszor 2 ml dietil éterrel extraháltunk szobahőmérsékleten, 10 perc ráztatás mellett. A harmadik kivonást követően 0,5 ml desztillált vízben 30 percig (teljes termés), ill. 600 percig (embrió) állni hagytuk a visszamaradt növényi szövetet (enzimatis hidrolízis). Az enzimatisan hidrolizált szöveteket 5 ml dietil éterrel 1 percig extraháltuk szobahőmérsékleten alaposan összerázva centrifugálás előtt. A dietil éteres frakciókat 30-40°C-on szárítottuk, előállítva a NTAE-ot.

Tiszta arktigenin izolálása *J. mollis*-ból

Az embrióból származó NTAE -t 2 ml metanolban oldottuk vissza és 500 µl-es frakcióit injektáltuk preparatív HPLC-készülékbe.

Analitikai HPLC-UV-MS és HPLC-TOF-MS vizsgálatok

Agilent 1260 Infinity HPLC rendszert használtunk (G1312B bináris gradiens pumpa, G1367E mintaadagoló, G1315C diódasoros detektor, GraceSmart RP18 (5µm) kolonnával, 150mm×4.6mm (Grace Davison Discovery Sciences Lokeren, Belgium).

Áramlás: 1 ml/perc, eluens: A: acetonitril:0,07M ecetsav (15:85, V/V), B: acetonitril:0,07 ecetsav (85:15 V/V), gradiens: lineáris, 0,0 perc, 15% B; 12,0 min, 44% B, injektálát térfogat: 10 µl. A *Cirsium* fajok kromatogramjait 280 és 348 nm, míg a *Carduus nutans* kromatogrammait 280 nm hullámhosszon regisztráltuk. A tömegspektrometriás analízisek során *Cirsium* fajok esetében negatív ion módot, *Carduus nutans*-nál pozitív ion módot alkalmaztunk.

A pontos tömeg meghatározásához: Agilent 6230 repülési idő (TOF) tömegspektrométer Jet Stream electrospray ionforrással (ESI), *Cirsium* fajoknál negatív, míg *Carduus nutans* és *Jurinea mollis* esetében pozitív ion módot alkalmaztunk.

Működési paraméterek: készülék által optimalizálva. **Analitika HPLC-Orbitrap-MS**

Készülék: Dionex Ultimate 3000 UHPLC rendszer (3000RS diódasoros detector (DAD), TCC-3000RS oszlop termosztát, HPG-3400RS pumpa, WPS-3000TRS mintaadagoló) és Orbitrap Q Exactive Focus tömegspektrométer (electrospray ionizáció (ESI) került felhasználásra. Oszlop: Kinetex C18 (75 × 3.0 mm; 3.5 µm) (Phenomenex). Eluensek: 0.1% V/V hangyasav (A) és acetonitril (B). Grádiens: lineáris, 0,0 perc, 20% B; 12,0 min, 60% B. Áramlási sebesség: 0.3 mL/perc. Injektált térfogat 1,0 µL. Ionizáció: negatív mód. Működési paraméterek: készülék által optimalizálva. Tömegtartomány (Full-MS) 100-1000 *m/z*. MS/MS detektálás: ütközés indukálta disszociáció 10, 20, 30 és 45 eV esetén. UV spektrum: 250 és 600 nm tartományban felvéve.

Preparatív HPLC

Oszlop: Nucleosil100, C18 (10 μm), 15 \times 1 cm), melyet az analitikai HPLC-hez kapcsoltuk (Agilent 1260 Infinity HPLC rendszer). A korábban leírt analitikai módszertől az alábbiakban térünk el: áramlás: 3 ml/perc és injektálás: 500 μl .

Mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR)

A *Cirsium* fajokból izolált vegyületek NMR adatait metanol-d₄-ben vettük fel 25°C-on Varian DDR spektrométerrel **Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia**

Az izolált vegyületek CD spektrumát metanolban Jasco J720 Spectropolarimeterrel vettük fel.

A vegyületek mennyiségi meghatározása

Az összetevők mennyiségi meghatározása külső standard kalibrációs módszerrel történt. A kalibrációhoz felhasznált vegyületek általunk izolált lignánok (balanofonin, prebalanofonin, pikrazmalignán, prepikrazmalignán, dezmetil-balanofonin, dezmetil-pikrazmalignán, pinorezinol) és vásárolt standardok (arktigenin, klorogénsav, cinarin) voltak.

Főkomponens analízis (PCA)

Főkomponens analízist végeztünk Minitab 18 Statisztikai Software-rel, melyben a kilenc *Cirsium* fajt és az azokból izolált tíz vegyületet analizáltuk.

Sejtosztódásgátló vizsgálatok

A kísérleteket SW480 vastagbél-daganatsejteken végeztük, melyeket 37°C-on, 5% CO₂-os atmoszférában, Roswell Park Memorial Institute tápközegben (RPMI-1640) tartottuk (10% magzati szarvasmarha-szérum, 10 U/ml penicillin és 10 $\mu\text{g/ml}$ sztreptomycin).

A sejtosztódás gátlás vizsgálatára (szulforhodamin-B – SRB módszerrel) 96 lyukú tenyésztő lemezekre (3000 sejt/lyuk), melyek tartalmazták az izolált vegyületeket: a balanofonint, dezmetil-balanofonint, pikrazmalignánt és dezmetil-pikrazmalignánt 25, 50 és 100 μM -os, a prebalanofonin és prepikrazmalignán 50 és 100 μM -os, míg a podofillotoxin 10 és 20 μM -os koncentrációban, melyeket 48 órán keresztül inkubáltunk. A negatív kontroll sejteket a tápközegben inkubáltuk. A sejtosztódásgátló hatást szulforhodamin-B (SRB) kolorimetriás módszerrel végeztük.

3.3. Sejt és szövetkultúrák

***In vitro* kultúrák létrehozása**

Cirsium boujartii és *Anthriscus cerefolium* érett terméseit 70% (V/V) nátrium-hipiklorit oldattal sterilizáltuk 10 percen keresztül. Steril szűrőpapíron történő szárítást követően félbevágtuk a terméseket és növekedésszabályozókat tartalmazó feles és teljes erősségű MS (Murashige-Scoog) táptalajra helyeztük. A táptalajok 3% cukrot és 7% (m/m) agart tartalmaztak. A pH-t 5,7-re állítottuk autoklávozás (20 perc 121°C) előtt.

A kultúrák 12/12 órás fotoperiódus mellett (kb. 3000 lux) vagy sötétben fejlődtek. A passzálás havonta történt.

Sejtkultúrák

Anthriscus cerefolium kalluszból sejtszuszenziót hoztunk létre. A sejtszuszenzió táptalaja nem tartalmazott agart, a korábban használt táptalajjal szemben. 2-2 g kalluszt helyeztünk 40 ml táptalajba. A kultúrákat 22°C-on neveltük fényen (kb. 3000 lux) (sötét periódus nélkül és 100 rpm-en ráztattuk, A passzálás havonta történt.

Elicitálás

A sejtkultúrák 7 napig fejlődtek elicitálás előtt. Az elicitorokat a növekedési fázis lineáris szakaszában adtuk a kultúrákhoz: 10 µM jazmonsavat és szalicilsavat, ill. 50 µg/ml élesztőkivonatot, míg a kontroll kultúrákhoz desztillált vizet. Az inkubációs idő 1, 3, 5, és 7 nap volt. A vizsgálatot háromszoros ismétlésben végeztük.

4 EREDMÉNYEK

4.1 A *Cardueae* fajok terméseinek fitokémiai vizsgálata

A *Jurinea mollis* terméseinek vizsgálata

Intakt és enzimatikusan hidrolizált terméskivonatok fitokémiai összetételét határoztuk meg HPLC-UV módszerrel. Enzimátikus hidrolízis hatására jellegzetes átalakulást mutatott az intakt termésben detektált fő vegyület. Az elbomló és a keletkező vegyület LC-MS adatai (pozitív ion módban) alapján: a protonált molekulaionok az intakt termésben található vegyület esetében m/z 535, míg a hidrolizált mintában m/z 373 voltak. A 162 Da egységnyi különbség egy hat szénatomos cukor, feltehetően glükóz egység jelenlétére utal. A két vegyületet preparatív HPLC-vel izoláltuk és CD és NMR spektroszkópiásan azonosítottuk arktiinként (glükozid) és arktigeninként (aglikon).

Az izolálás optimalizálásához a termések lignántartalmát vizsgáltuk az érési folyamat során. Az érett termés tartalmazta a legnagyobb mennyiségben a lignánokat. Az embrió és a teljes termés arktiin és arktigenin-tartalmát vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a két vegyület kizárólag az embrióban voltak jelen (71,5 mg/g arktiin és 2,23 mg/g arktigenin). Szintén az embriót és a teljes termést vizsgáltuk a hidrolízis optimalizálása érdekében. A kvantitatív glikozid-aglikon átalakulás mindkét szövet esetében lezajlott, azonban szignifikáns különbség mutatkozott a reakcióhoz szükséges időben. A teljes hidrolízis teljes termésben 30 perc alatt, míg embrióban 600 perc alatt zajlott le.

Ezzel a módszerrel 200 mg egész termésből 7,9 mg míg 200 mg embrió szövetből 12,5 mg nagy tisztaságú arktigenin volt előállítható (az eredmények három párhuzamos mérés átlagát mutatják).

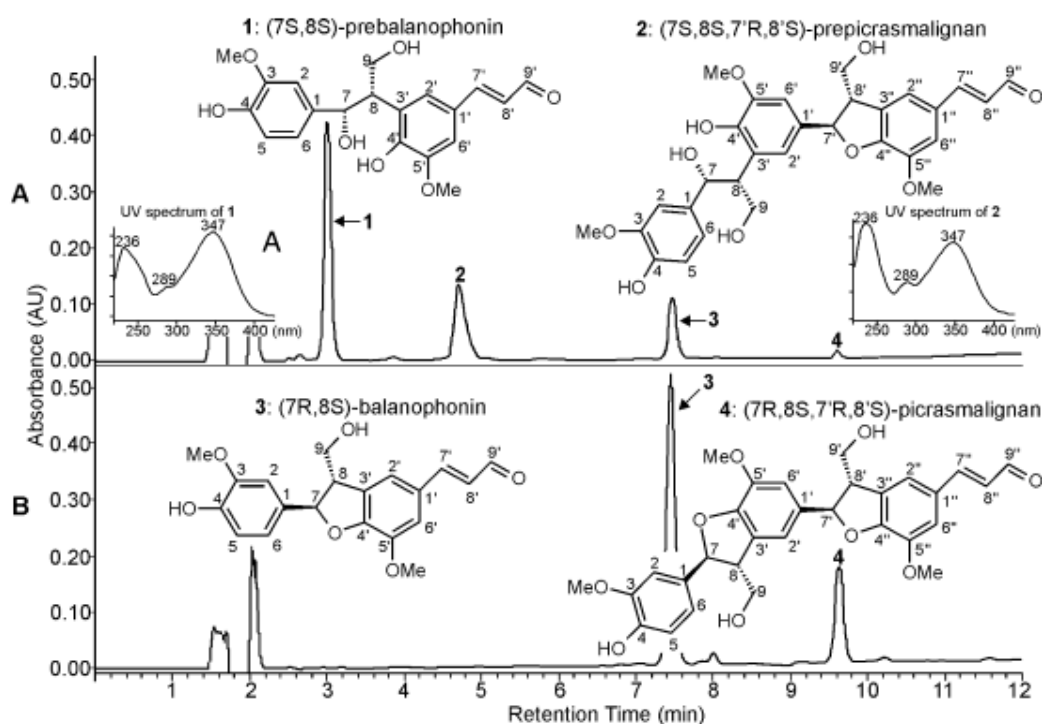
A *Carduus nutans* terméseinek vizsgálata

A *Carduus nutans* terméseinek HPLC-UV-MS (TOF-MS és Orbitrap-MS párhuzamosan) vizsgálata során egy fő csúcsot detektáltunk, melynek összegképlete $C_{20}H_{22}O_6$ volt. Ez pinorezinol jelenlétét bizonyítja a termésekben. A termésbeli mennyiségének meghatározása után megállapíthatjuk, hogy a *C. nutans* termése a pinorezinol nagy mennyiségben történő izolálására alkalmas. A vegyület szerkezetét NMR és optikai rotációs spektroszkópiával egyértelműen bizonyítottuk.

A *Cirsium boujartii* terméseinek fitokémiai vizsgálata

Először vizsgáltuk a *C. boujartii* terméseit: intakt, és savkezelt formában egyaránt. Az extraktumokban négy vegyületet detektáltunk. Savkezelés hatására jellegzetes átalakulást figyeltünk meg, az 1-es és a 2-es vegyület mennyiségileg a 3-as és a 4-es vegyületté alakult. A HPLC-UV kromatogramok és a jellegzetes viselkedés savkezelés hatására, a korábban már vizsgált, és *C. eriophorumban* azonosított négy vegyülettel voltak azonosak, ezek: prebalanofonin, prepikrazmalignán, balanofonin és pikrazmalignán.

A prebalanofonin és a prepikrazmalignán nagy mennyiségben volt jelen az intakt termésben, és kvantitatívan balanofoninná és pikrazmalignánná alakult. HPLC-UV-TOF-MS, NMR és CD módszerekkel meghatároztuk a szerkezetüket, mint (7R,8S)-balanofonin, (7R,8S,7'R,8'S)-pikrazmalignán, (7R,8S)-prebalanofonin és (7R,8S)-prepikrazmalignán.



1. ábra A *Cirsium boujartii* intakt (A) és savkezelt (50°C) mintáinak (B) HPLC-UV profilja ($\lambda = 347$ nm) a vegyületek szerkezetével, és a balanofonin, illetve a pikrazmalignán UV spektrumával együtt.

A *Cirsium rivulare* terméseinek összetétele

Vizsgáltuk a *C. rivulare* terméseinek intakt és enzimatikusan hidrolizált kivonatait. A hidrolízist követően jellegzetes, kvantitatív átalakulást figyeltünk meg két komponens esetében is, míg két csúcs területe változatlan maradt.

HPLC-TOF-MS vizsgálattal azonosítottuk a két vegyületet, melyek hidrolízis hatására átalakulást mutattak. Az intakt termés kivonatában a két lignán glikozid: trachelozid és arktiin volt kimutatható, melyek a hidrolízist követően trachelogeninné és arktigeninné alakultak.

A két vegyület, melyek hidrolízissorán változatlan mennyiségben megmaradtak, izoláltuk és HPLC-TOF-MS vizsgálattal meghatároztuk az összegképletüket ($C_{19}H_{18}O_6$ és $C_{29}H_{28}O_9$). A korábban *C. boujartii*-ben azonosított balanofoninnal és pikrazmalignánnal összevetve a két vegyületet dezmetil-balanofoninként és dezmetil-pikrazmalignánként azonosítható, melyek új természetes vegyületek. NMR spektroszkópiával megerősítettük, hogy a két vegyület a 3-O-dezmetil származéka a balanofoninnak és a pikrazmalignánnak.

A *Cirsium* fajok kemodiverzitása a terméseik lignánösszetétele alapján

A *C. boujartii* és *C. rivulare* terméseinek vizsgálata során három neolignánt (dezmetil-balanofonin, prebalanofonin, balanofonin) és három szeszvineolignánt (dezmetil-pikrazmalignán, prepikrazmalignán, pikrazmalignán) és négy lignánt (trachelozid, arktiin, trachelogenin, arktigenin) azonosítottunk. Feltételeztük, hogy a kutatócsoportunk által korábban már vizsgált *Cirsium* fajokban a fent említett vegyületek is jelen lehetnek, így újra vizsgáltuk ezek (7 *Cirsium* faj) termését, minden azonosítható lignán/neolignán/szeszvineolignán kimutatása céljából.

A *Cirsium* fajok klasszikus taxonómiai felosztását követve (Cephalonoplos, Chamaeleon és Eriolepis szekciók), a termelődő lignánok, neolignánok és szeszvineolignánok előfordulása és mennyisége alapján ezen vegyületek kemotaxonómiai jelentőségét bizonyítottuk. A Chamaeleon szekcióban a lignán glikozidok, míg az Eriolepis szekcióban a neo- és szeszvineolignánok voltak karakterisztikusak.

Főkomponens analízissel is alátámasztottuk az Eriolepis szekcióba tartozó három faj (*C. boujartii*, *C. eriophorum*, *C. vulgare*) szoros kemotaxonómiai kapcsolatát.

Az izolált neo- és szeszvineolignánok sejtsztódásgátló hatása SW480 adenokarcinóma sejtvonalon.

Irodalmi adatok alapján a balanofonin szignifikánsan gátolta az SW480 adenokarcinóma sejtvonal sejtsztódását, mely összevethető volt az etopozid hatásával. Ezért az általunk, *Cirsium* fajokból izolált vegyületek sejtsztódásgátló hatását ezen a sejtvonalon végeztük.

Szignifikáns sejtsztódásgátló hatás volt megfigyelhető (50%, 50 μ M koncentrációnál) a balanofonin, pikrazmalignán, illetve ezek dezmetil származékai esetében, amíg a prebalanofonin és a prepikrazmalignán, feltételezhetően a nagyobb polaritásuk miatt, hatástalanok voltak.

A *Cirsium boujartii* in vitro kultúrái

A két különböző növekedésszabályozó-tartalmú táptalajon (2 mg/l benziladenopurin + 1 mg/l naftilecetsav; 0,1 mg/l indolvajsav + 1 mg/l benziladenopurin) és különböző kondíciók alatt (12/12 órás fotoperiódus és teljes sötét) nevelt kallusz kultúrák kémiai vizsgálatát HPLC-UV-

MS-sel végeztük. A kultúrák minden esetben egy detektálható vegyületet termeltek, mely UV spektruma jelentősen eltért a korábban, a növény terméseiben azonosított lignán típusú vegyületekétől. Az ismeretlen összetevőt preparatív HPLC-vel izoláltuk és tömegspektrometriás (TOF-MS és Orbitrap-MS), illetve NMR spektroszkópiás módszerekkel azonosítottuk 1,5- dikaffeoil kinasavként.

Az *Anthriscus* fajok föld feletti részeinek fitokémiai vizsgálata

A három faj: *A. caucalis*, *A. cerefolium* és *A. sylvestris* föld feletti részeit vizsgáltuk (HPLC-UV-MS módszerrel), melyekben különböző kávésav-származékokat (klorogénsavat, 1,5-dikaffeoil kinasavat, és két dikaffeoil kinasav-malonil származékot) detektáltunk, de lignánokat nem.

A klorogénsav számos növényfajban, nagyobb mennyiségben előforduló vegyület, kimutatása kisebb jelentőségű. Ezzel szemben a dikaffeoil-kinasav és származékai ritka, értékes vegyületek. Az *A. cerefolium* tartalmazta a legnagyobb mennyiségben a dikaffeoilkinasavat és az egyik malonil származékot, míg *A. sylvestrisben* az 1,5-dikaffeoil kinasav volt jellemző. *A. caucalisban* sem az 1,5-dikaffeoil kinasav, sem a malonil származék nem volt jelen.

Az *Anthriscus cerefolium in vitro* kultúrái

A másodlagos anyagcseretermékek termelődése érdekében a kultúrákat növekedésszabályozót (2 mg/l 2,4-diklórfenoxiecetsav + 2 mg/l benziladenopurin) tartalmazó MS táptalajon neveltük és jazmonsavval, szalicilsavval és élesztőkivonattal (mint elicitorok) kezeltük.

A kultúrák fő vegyületeként klorogénsavat és 1,5-dikaffeoil kinasavat termeltek. Lignánokat, és az intakt növény által termelt dikaffeoil kinasav malonil származékokat viszont nem.

Elicitálást követően a kezelt kultúrák trikaffeoil kinasav származékot termeltek. A különböző elicitorok mind fokozták a vegyület termelését, közülük a jazmonsav bizonyult a leghatásosabbnak.

5 KÖVETKEZTETÉSEK

1. Elsőként írtunk le egy értékes butirolakton típusú lignán glikozid/aglikon pár jelenlétét (arktiin, arktigenin) *Jurinea mollis* terméseiben. Endogén enzimatis hidrolízissel az arktiint kvantitatívan arktigeninné tudtuk alakítani a termésekben. A lignánok termérsz-specifikus felhalmozódása kiemelkedően magas arktigenin szintet eredményezett az enzimatisan hidrolizált embrióban (50,7 mg/g), aminek köszönhetően 74,2% tisztaságú arktigenin tartalmú extraktumot tudunk előállítani egy egyszerű, háromlépéses izolálási módszerrel.
2. A *Carduus nutans* termései a furofurán típusú lignán, a pinorezinol gazdag forrásának bizonyultak (7,8 mg/g a száraz termésben), melyből nagy mennyiségben tudtuk izolálni a vegyületet.
3. Két új természetes vegyületet, egy neolignánt és egy szeszkvineolignánt (dezmetil-balanofonin és dezmetil pikrazmalignán) és további hat, már ismert vegyületet (balanofonin, pikrazmalignán, prebalanofonin, prepikrazmalignán, arktiin, arktigenin, trachelozid és trachelogenin) azonosítottunk kilenc *Cirsium* faj fitokémiai vizsgálata során. A *Cirsium* fajokban kimutattuk i) a vegyületek kemotaxonómiai jelentőségét, ii) átalakulási képességét savkezelés, ill. enzimatis hidrolízis hatására, iii) kiválasztottuk az optimális forrásokat az izoláláshoz. Így *C. rivulare* hidrolizált terméséből a dezmetil-balanofonint és dezmetil-pikrazmalignánt, *C. boujartii* és *C. eriophorum* intakt terméséből a prebalanofonint és a prepikrazmalignánt, míg savkezelt kivonataikból a balanofonint és a pikrazmalignánt tudtuk szennyezésmentesen izolálni.
4. A vegyületek között a balanofonin, pikrazmalignán, dezmetil-balanofonin és dezmetil-pikrazmalignán szignifikánsan gátolta a sejtosztódást SW480 adenokarcinóma sejtvonalon, amíg a prebalanofonin és a prepikrazmalignán hatástalanok voltak. Eredményeink rávilágítottak a *Cirsium* fajokban azonosított lignánok jelentőségére.
5. A *Cirsium boujartii* kallusza fő komponensként 1,5-dikaffeoil kinasavat termelt, azonban lignánokat nem. A lignánok jelenlétének hiánya miatt feltételezzük, hogy a kalluszban ezek bioszintetikus útvonala valamilyen formában blokkolt, és a kávésavszármazékok a lignán szintézis kezdeti lépéseiben szerepelhetnek.

6. Kávésav származékokat detektáltunk a három vizsgált *Anthriscus* faj (*A. caucalis*, *A. cerefolium*, *A. sylvestris*) föld feletti részében. *In vitro* kultúrákat hoztunk létre *A. cerefolium*-ból, melyek optimalizált elicitálást követően (jazmonsavval 7 napig kezelve) fő komponensként 1,5-dikaffeoilkínasavat termeltek.

6 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

Könye R, Ress ÁE, Sólyomváry A, Tóth G, Darcsi A, Komjáti B, Horváth P, Noszál B, Molnár-Perl I, Béni Sz, Boldizsár I. (2016) Enzyme-hydrolyzed fruit of *Jurinea mollis*: a Rich source of (-)-(8R,8'R)-Arctigenin. *Nat Prod Commun*, 11(10): 1459-1462.

Könye R, Tóth G, Sólyomváry A, Mervai Zs, Zürn M, Baghy K, Kovalszky I, Horváth P, Molnár-Perl I, Noszál B, Béni Sz, Boldizsár I. (2018) Chemodiversity of *Cirsium* fruits: Antiproliferative lignans, neolignans and sesquinelignans as chemotaxonomic markers. *Fitoterapia*, 127: 413-419.

Sólyomváry A, Alberti Á, Darcsi A, **Könye R**, Tóth G, Noszál B, Molnár-Perl I, Lórántfy L, Dobos J, Órfi L, Béni Sz, Boldizsár I. (2017b) Optimized conversion of antiproliferative lignans pinoresinol and epipinoresinol: Their simultaneous isolation and identification by centrifugal partition chromatography and high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*, 1052: 142-149.