

A PD 75383 kutatási pályázat zárójelentése

Vezető kutató: Hunyadi Attila, Ph.D.

egyetemi adjunktus

SZTE-GYTK Farmakognózi Intézet

I. Bevezetés

A fehér eperfalevél a Távol-Keleten több évezredes hagyománnyal rendelkezik a tradicionális gyógyításban, többek között magas vércukor szint kezelésére. Ez a javallat megjelenik csaknem minden olyan kultúra hagyományos orvoslásában, ahol ezt a fajtát meghonosították. A hazánkban kevésbé közismert alkalmazás valószínűleg elfeledett tudásra utal: pl. Erdélyben és Vajdaságban mindmáig találhatunk „füvesembereket”, akik az eperfalevél teát (is) javasolják ilyen célra. Nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésre ugyanakkor a magyar, sőt az egyéb európai országokból származó eperfalevél hatásosságáról és kémiai összetételéről is.^{1,2}

A kutatás legfontosabb célja a hazai eperfalevél antidiabetikus hatóanyagainak feltérképezése volt komplex, hatáskövetett izolálási munka keretében, ill. lehetőség szerint új vércukorszint-csökkentő, esetleg egyéb biológiai hatással rendelkező tartalomanyagok felfedezése.

II. Kísérleti tervezés, legfontosabb eredmények

Az előkísérleteket az ásványi tanyavilágban 2006. augusztusban begyűjtött mintákból végeztük. 2007. májusában 5,64 kg, később, a hatástani vizsgálatok nagy anyagigényének kielégítésére pedig 2010. júniusában további 8,2 kg mintát gyűjtöttünk be és dolgoztunk fel hasonlóan. A begyűjtéseket igyekeztünk ugyanazon területről végezni.

A kutatás során a diabétesz összetett patomechanizmusának megfelelően több szálon, helyenként párhuzamosan haladva, számos farmakológiai modell felhasználásával igyekeztünk minél több értékes információt nyerni a feldolgozott minták hatásáról és az ezért felelős kémiai anyagokról. Az izolált anyagok szerkezetét egy- és kétdimenziós NMR, MS/MS és HRMS segítségével határoztuk meg, illékony tartalomanyagokat GC-FID és GC-MS segítségével vizsgáltunk, egyes tartalomanyagokat pedig HPLC-DAD és ismert referencia-anyagok segítségével azonosítottunk ill. határoztunk meg mennyiségileg. Az alkalmazott farmakológiai modellek az alábbiak voltak:

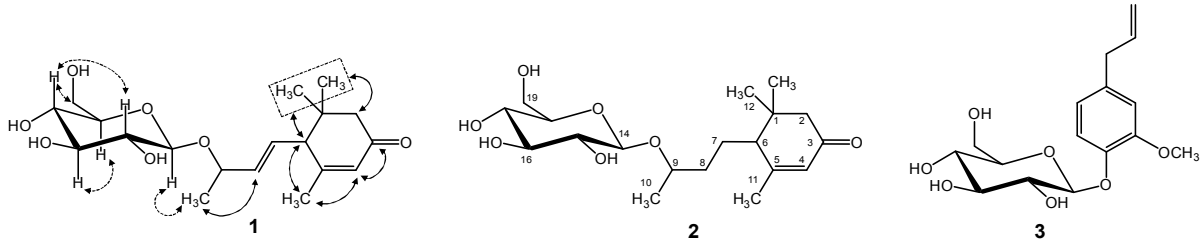
- a. *In vivo*: normál patkányok keményítőterhelés utáni posztprandiális hiperglikémiája (1. modell); újszülöttkori streptozotocin kezeléssel kialakított II. típusú diabéteszes patkányok posztprandiális hiperglikémiája (2. modell); hiperurikémiás patkányok húgysavszintje (a magas húgysavszint és a diabétesz egymásnak oda-vissza súlyos rizikófaktora; 3. modell)
- b. *In vitro*: zsírszövetek 24 órás glükózfelhasználása inzulin jelenlétében (4. modell) és anélkül (5. modell); antioxidáns hatások vizsgálata (a diabétesz progressziójában az oxidatív stressz jelentős szerepet játszik) – patkánygyomor-homogenizátumok lipidperoxidációjának gátlása (6. modell), DPPH szabadgyök-fogó hatás (7. modell); xantin-oxidáz gátlás (a húgysavszint alakulásában és az oxidatív stresszben játszott szerepe miatt; 8. modell)

Az *in vitro* 4. és 5. modelleken a vizsgálatokat az OTKA engedélyével megváltoztatott külföldi partnerrel (Dr. Tusty-Juan Hsieh, Kaohsiung, Tajvan) együttműködve végeztük. A zárójelentés idején kezdünk további vizsgálatokat az eperfalevél minták vázizomsejtek glükózfelhasználására kifejtett hatására; az együttműködés jóval sikeresebbnek bizonyult, mint az eredetileg tervezett partnertől vártuk.

1. Előkísérlet

A kivonást előkísérletben forró vízzel, 50% metanollal, 70% etanollal, metanollal, diklórmétánnal és n-hexánnal végeztük el. Az 50% metanolos kivonatot (200g szárított levélből, 24g) több lépés

tisztításnak vetettük alá (oldószer-oldószer megosztás, frakcionált kicsapás, fordított fázisú oszlopkromatográfia, rotációs rétegekromatográfia, NP- ill. RP-HPLC), ekdiszteroidok izolálása/detektálása céljából. Viszonylag jelentős mennyiségű 20-hidroxiokdizont mutattunk ki, hasonló viselkedésű kísérőanyagai azonban az alábbi megastigmán glikozidoknak (**1,2**) bizonyultak. Ezek mellett egy fenilpropán származékot (eugenol-glikozid, **3**) is izoláltunk.



1. ábra. Az 50% metanolos kivonatból izolált tartalomanyagok, a megastigmánok legfontosabb HMBC (folytonos nyíl) és NOESY correlációival (szaggatott nyíl). Ezen két anyagra irodalmi adatok alapján 6R,9R konfigurációt valószínűsítettünk.⁶

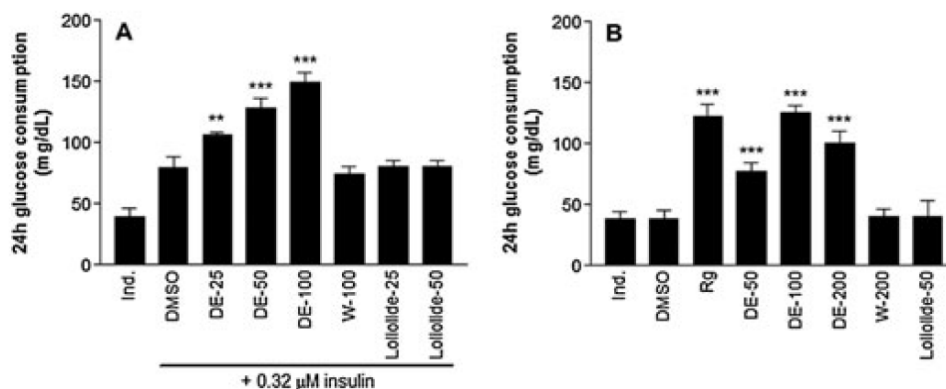
1 és **2** a Moraceae család új tartalomanyagai, amelyek közeli szerkezeti rokonságban vannak egy patkányok β -sejtjeiből szignifikáns inzulinfelszabadulást kiváltani képes anyaggal.³ **2** aglikonja ugyanakkor a hem oxigenáz-1 és SIRT1 expressziójának fokozásán⁴ keresztül jelentős antidiabetikus potenciállal rendelkezik: különösen a SIRT1 a diabétesz kezelésének egyik rendkívül fontos új támadáspontja;⁵ a hivatkozott 2007-es Nature közlemény jelenlegi idézettsége 660 (Scopus).

Az aglikonok szerepének vizsgálata érdekében tanulmányoztuk a bélflóra hatását a két megastigmán glikozidra (a humán bélflórát probiotikummal modelleztük: Probiotik kapszula, Naturpharma), s 72 órás fermentáció után az aglikonok kb. 60-70%-os felszabadulását tapasztaltuk.⁶ A keletkezett anyagokat izoláltuk, és szerkezetüket NMR segítségével is megerősítettük.

2. Főkérdés

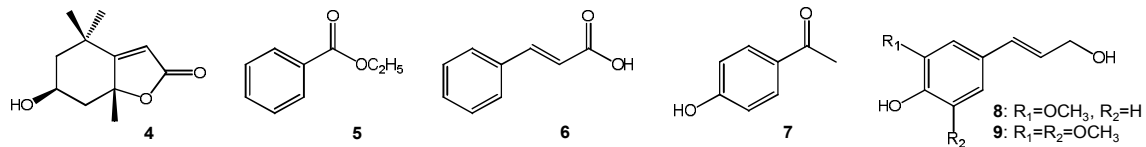
2.1. Az eperfelevél tea glikozidusan kötött illó anyagainak vizsgálata

A fenti megastigmánokhoz hasonlóan esetlegesen a bélflóra hatására szabadabbá váló antidiabetikus tartalomanyagok vizsgálatához vizes kivonatot állítottunk elő (60°C, ultrahangos fürdő), egy részét bakteriálisan fermentáltuk (az előkísérletben használt probiotikummal), s centrifugálás után a felülúszót diklórmetánnal kiráztuk. A vizes kivonatot fermentálás nélküli diklórmetános extraktumát (DE) is előállítottuk. A fermentátum összetétele és hatása nehezen volt reprodukálható. β -glikozidázal is megkíséreltük az aglikonok felszabadítását, de (valószínűleg a levélben jelen lévő nemszelektív glikozidáz-gátlók miatt) ez nem vezetett eredményre. A DE frakció ugyanakkor szignifikáns dóziszfüggő hatást váltott ki az *in vitro* 3. és 4. modelleken (a perifériás glükózfelvétel inzulin-független fokozása).



2. ábra. DE hatása az *in vitro* 4. (A) és 5. (B) teszteken. Ind.: negatív kontroll, dózisek: μ g/ml, W: vizes kivonat, Rg: 50 μ g/ml roziglitazon pozitív kontroll, ** ill. ***: $p < 0.01$ ill. 0.001 (ANOVA). 200 μ g/ml DE enyhe citotoxikus hatást váltott ki (B).

Méretnövelés után (1kg eperfalevélből 20 l vízzel nyert 300g kivonatból 0.66g DE) hatáskövetett frakcionálást kíséreltünk meg, a frakciók azonban nem bizonyultak hatásosnak; egyes tartalomanyagok szinergista hatását gyanítjuk ennek háttérében. A fő (GC-FID alapján 40,3%) tartalomanyagot izoláltuk és szerkezetét (–)-loliolidként (**4**) határoztuk meg. A DE frakcióban GC-MS segítségével számos klasszikus és rövidült oldalláncú fenilpropán származékot mutattunk ki (etilbenzoát, **5**; *t*-fahéjsav, **6**; *p*-hidroxiacetofenon, **7**; *t*-koniferilalkohol, **8**; szinapilalkohol, **9**).

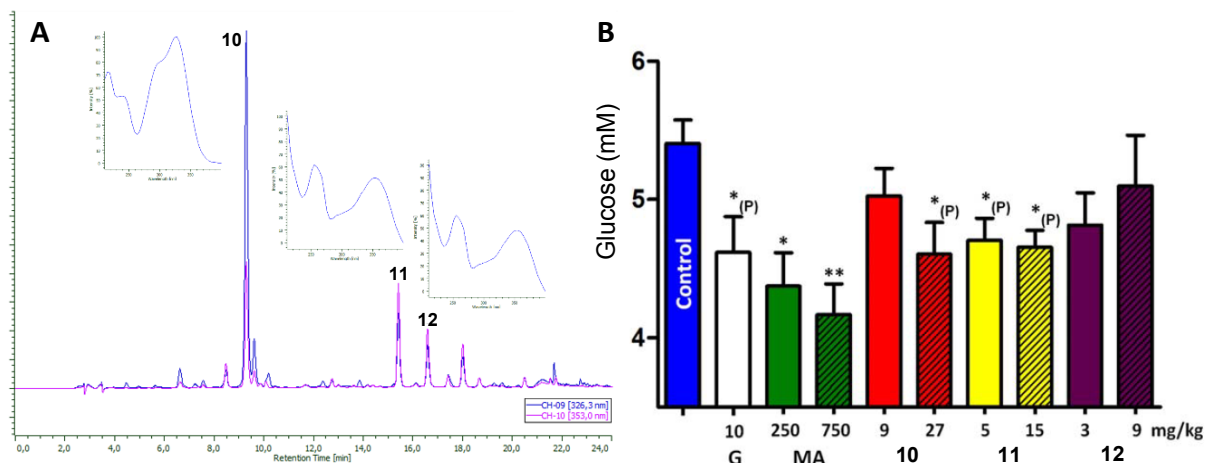


3. ábra. A DE frakcióból izolált/azonosított tartalomanyagok

A loliolid inaktívnak bizonyult, enyhe antioxidáns, citoprotektív és T- és B-sejtes immunszuppresszáns hatásának köszönhetően ugyanakkor szerepet játszhat a diabétesz progressziójának enyhítésében.⁷

2.2. A 70% etanolos kivonat hatása és analitikai vizsgálata

Az eperfalevél nagy mennyiségben történő feldolgozásához az oldószer kiválasztásakor igyekeztünk termékfejlesztési szempontokat figyelembe venni (oldószermaradék vizsgálatok, stb.). Az előkísérletek alapján a 70% etanolos kivonást választottuk. A nyers kivonat egyszeri 750 mg/kg dózisa normál patkányok posztprandiális hiperglikémiájára nem fejtett ki hatást, II. típusú diabéteszes patkányokon (*in vivo* 2. modell) azonban hatásos volt.⁸ Hosszabb, 11 napos kezelés után a 2. modellen 250 ill. 750mg/kg/nap dózisban vizsgálva szignifikáns, dóziszfüggő hatást tapasztaltunk. A HPLC-DAD segítségével azonosított fő UV aktív tartalomanyagokat (klorogénsav, **10**; rutin, **11**; izokvercitrin, **12**) irodalmi előzmények alapján fontos hatáshordozóknak gyanítottuk. Egyszerű, szelektív HPLC módszert dolgoztunk ki kvantitatív meghatározásukra (rendre 3,58±0,06%, 1,96±0,03% és 1,20±0,02%), és hatásukat megvizsgáltuk azokban a dózisokban, amely megfelel az eperfalevél kivonatban található mennyiségeiknek. Arra a meglepő következtetésre jutottunk, hogy – durva közelítéssel – a teljes vércukorszint csökkentő hatás kb. 50%-ban megmagyarázható lehet a klorogénsav és a rutin jelenlévő mennyiségeivel, míg az izokvercitrin jóval csekélyebb mértékben, vagy egyáltalán nem járul hozzá a hatáshoz.⁹

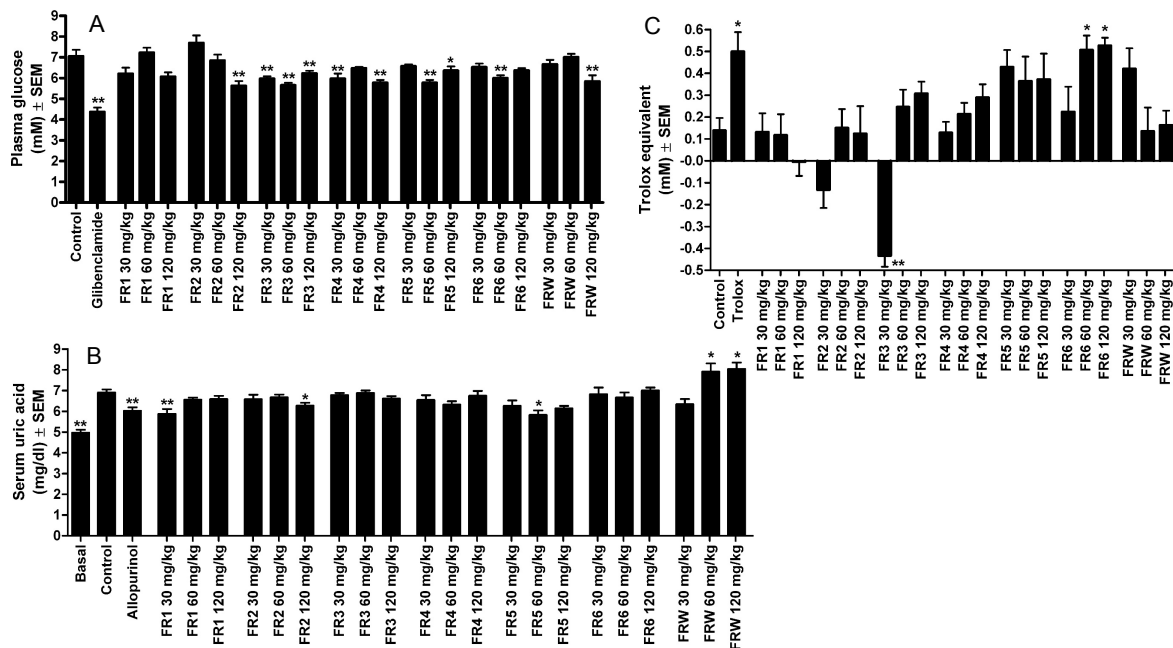


4. ábra. Az etanolos kivonat kromatogramja $\lambda=326,3$ (kék) és 353 (lila) nm-en (A), és a hatások II. diabéteszes patkányokon (B). **10:** klorogénsav, **11:** rutin, **12:** izokvercitrin, **G:** glibenclamid pozitív kontroll, **MA:** nyers kivonat

2.3. A 70% etanolos kivonat feldolgozása

A 2007. májusában begyűjtött mintából 675,4 g kivonatot nyertünk, ennek először kis mennyiségeit frakcionáltuk Cellite állófázison illetve szilikagélen különböző kivonat-töltet arányokkal, ill. folyadék-

folyadék megosztást alkalmaztunk víz és hexán, diklórmétán, etilacetát majd butanol között. Végül víz-butanol közötti folyadék-folyadék megosztást követően a butanolos fázis szilikagélen való elválasztása mellett döntöttünk. Diklórmétán és diklórmétán:etanol elegyek lépcsős gradiensként való alkalmazásával 6 jelentősen eltérő polaritású és összetételű frakciót nyertünk. Az *in vivo* 2. modell kivételével (a szükséges nagy állatszám miatt) valamennyi teszten megvizsgáltuk a frakciók hatását, a frakciókat HPLC-DAD segítségével analizáltuk és fő UV-aktív tartalomanyagai mennyiségét meghatároztuk. Az iminocukrok közül az 1-deoxinorimicin mennyiségét és a fagomin és a galaktozil-1-deoxinorimicin mennyiségének nagyságrendjét LC-MS/MS segítségével határoztuk meg. A minták iminocukor-tartalma rendkívül alacsony volt (max. néhány tízezrelék); ezek az anyagok az észlelt hatásokban minimális szerepet játszhattak.



5. ábra. Frakciók hatása az *in vivo* 1. (A) és 3. (B) ill. az *in vitro* 6. (C) modellen. FR1-6: az oldószer-oldószer megosztás butanolos fázisának szilikagélen nyert frakciói, FR-W: a vizes fázis.

A frakciók normál patkányokon kiváltott posztprandiális vércukorszint-csökkentő hatása (a nyers kivonat hatástalansága miatt) meglepő eredmény, és számos interakciót valószínűsít. Az *in vitro* 4., 5. és 8. modelleken egyik frakció esetében sem találtunk szignifikáns hatást, ezek a mechanizmusok tehát egy kevésbé feldolgozott fitoterapeutikum (pl. eperfalevél tea) esetén csekély szerepet játszanak az antidiabetikus hatásban.

Az 1. (legapolárisabb) frakció és a vizes fázis (legapolárisabb) relatíve értéktelennek, ill. utóbbi (húgsavszint emelő hatása miatt) nemkívánatosnak tekinthető. Az 5-ös frakció 9,79% izokvercitrint és 3,77% rutint, a 6-os pedig 8,99% klorogénsavat, 10,41% rutint és 5,64% izokvercitrint tartalmazott. Ez a két frakció mindkét modellünkön (*in vitro* 6. és 7.) jelentős antioxidáns hatásúnak is bizonyult. Eredményeink alapján a 6. frakció különösen értékes az antidiabetikus hatás (és esetleges termékfejlesztés) szempontjából.^{9,10}

A 2. frakció többlépcsős kromatográfiás tisztításával (fordított fázisú oszlopkromatográfia, rotációs rétegekromatográfia, preparatív rétegekromatográfia) a DE frakcióból is izolált loliolidot, valamint umbelliferont (7-hidroxikumarint) és egy további, azonosítatlan kumarinszármazékot nyertünk. Az umbelliferon irodalmi adatok alapján *i.p.* 30 mg/kg adagban *in vivo* antidiabetikus és antihyperglükémiás hatást vált ki patkányon, amely kb. 600 µg/kg glibenclamid hatásával ekvivalens.¹¹

Polaritásuk alapján a 4. és 5. frakcióban vártuk ekdiszteroidok ill. a korábban izolált megastigmán glikozidok és analógiák jelenlétét. Meglepő módon a frakció többlépcsős frakcionálása után sem sikerült ez utóbbi anyagokat kimutatni, annak ellenére, hogy a kiindulási nyersanyag nagyságrenddel nagyobb mennyiségű volt az előkísérletben feldolgozottnál. A 20-hidroxiiekdizon kimutatható, de nagyon csekély mennyiségű volt. Ez a két antidiabetikus hatású anyagcsoport mennyiségeinek erős vegetációfüggésére utal. Ezekkel a vizsgálatokkal párhuzamosan egy új nemzetközi együttműködés keretében (Dr. Daumantas Matulis, Vilnius, Litvánia) megkezdtük a növény fő ekdiszteroidja, a 20-hidroxiiekdizon metabolikus hatásaiért felelősnek gyanított mechanizmus tesztelését humán D-vitamin receptor-fehérjén, amely jelen pályázat egyes célkitűzéseit is magába foglaló, de azokon jelentősen túlmutató új kutatási témát nyithat.

III. Összefoglalás

A fentieknek megfelelően legfontosabb eredményeink az alábbiak szerint összegezhetőek.

1. Felismertük a hazai eperfalevél minták 2. típusú diabéteszben tapasztalt vércukorszint-csökkentő hatásának fő hatóanyagait, ezek mérésére kvantitatív analitikai módszert dolgoztunk ki, jelentős feldúsításukat egyszerű, gazdaságos, termékfejlesztésre alkalmas módon oldottuk meg.

2. Az 50% metanolos és 70% etanolos kivonat ill. a vizes kivonat diklórmétános extratumának farmakológiai és/vagy kémiai vizsgálata alapján a komplex antidiabetikus hatás számos fontos új elemét derítettük fel. Valamennyi izolált/detektált tartalomanyag összeköthető ezen hatással, akár közvetlen vércukorszint-csökkentő hatáson, akár a betegség progressziójának gátlásán keresztül.

3. Eredményeinket négy nemzetközi^{6,7,9,10} (össz. IF=8,476) és egy hazai³ folyóiratcikkekben publikáltuk. Két közlemény open access modellű (*PLoS ONE* ill. *Evid Based Complement Alternat Med*); a 2012 nov. 21-én megjelent *PLoS ONE* cikkre jelenleg hat független hivatkozás elérhető. A kutatás eredményeit három nemzetközi^{8,12,13} és egy hazai¹⁴ konferencia előadásban mutattuk be.

A *Morus alba* és egyéb rokon fajok megastigmánjainak SIRT1 expresszióra és aktivitásra kifejtett hatásának vizsgálata rendkívül ígéretes és aktuális téma. Ezzel a fő célkitűzéssel – a zárójelentés benyújtása idején nyílt új együttműködési lehetőségeket kihasználva – jelen kutatás a támogatási időszak lezárta után is tovább folytatódik.

Irodalomjegyzék (*: jelen kutatás eredményeit bemutató közlés)

1. Szendrei K, Csedő K, Hunyadi A. Gyógynövény alkalmazások a Kárpát-medencében: Mit ér az eperfalevél? I. rész. *Gyógyszerészet* 50: 243-248 (2006)
2. Szendrei K, Csedő K, Hunyadi A. Gyógynövény alkalmazások a Kárpát-medencében: Mit ér az eperfalevél? II. rész. *Gyógyszerészet* 50: 422-427 (2006)
3. Szendrei K, Kiss T, Hunyadi A. Növényi szerek helye a mai gyógyszerkincsben: Vércukorszint csökkentő hatású újabb növényi anyagok. *Gyógyszerészet* 56: 467-474 (2012)*
4. Park JH, Lee DG, Yeon SW, Kwon HS, Ko JH, Shin DJ, Park HS, Kim YS, Bang MH, Baek NI. Isolation of Megastigmene Sesquiterpenes from the Silkworm (*Bombyx mori* L.) Droppings and Their Promotion Activity on HO-1 and SIRT1. *Arch Pharmacol Res*, 34, 533-542 (2011).
5. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, Jin L, Boss O, Perni RB, Vu CB, Bemis JE, Xie R, Disch JS, Ng PY, Nunes JJ, Lynch AV, Yang H, Galonek H, Israelian K, Choy W, Iffland A, Lavu S, Medvedik O, Sinclair DA, Olefsky JM, Jirousek MR, Elliott PJ, Westphal CH. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*. 450(7170):712-716 (2007)

6. Hunyadi A, Herke I, Veres K, Erdei A, Simon A, Tóth G. Volatile glycosides from the leaves of *Morus alba* L. with a potential contribution to the complex anti-diabetic activity. *Nat Prod Commun*, közlés alatt*
7. Hunyadi A, Veres K, Danko B, Kele Z, Weber E, Hetenyi A, Zupko I, Hsieh TJ. *In vitro* Anti-diabetic Activity and Chemical Characterization of an Apolar Fraction of *Morus alba* Leaf Water Extract. *Phytother Res* 27: 847-851 (2013)*
8. Hunyadi A, Liktör-Busa E, Balogh Á, Hsieh TJ, Zupkó I, Hohmann J. Investigation of the antidiabetic activity of *Morus alba* leaf extract *in vitro* and *in vivo*. 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Berlin, Németország, 2010. aug. 29 - szept 2. *Planta Med* 76: P098 (2010)*
9. Hunyadi A, Martins A, Hsieh TJ, Seres A, Zupko I. Chlorogenic Acid and Rutin Play a Major Role in the *In Vivo* Antidiabetic Activity of *Morus alba* Leaf Extract on Type II. Diabetic Rats. *PLoS ONE* 7(11): e50619 (2012)*
10. Hunyadi A, Liktör-Busa E, Márki Á, Martins A, Jedlinszki N, Hsieh TJ, Báthori M, Hohmann J, Zupkó I. Metabolic effects of mulberry leaves – exploring potential benefits in type 2 diabetes and hyperuricemia. *Evid Based Complement Alternat Med*, közlés alatt*
11. Ramesh B, Pugalendi KV. Antihyperglycemic effect of umbelliferone in streptozotocin-diabetic rats. *J Med Food* 9(4): 562-566 (2006)
12. Hunyadi A, Hsieh TJ, Veres K, Roza O, Zupkó I. *In vitro* activity and chemical characterization of an apolar fraction of *Morus alba* hot water extract. 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Antalya, Törökország, 2011. szept. 4 – 9. *Planta Med* 77: PF56 (2011)*
13. Hunyadi A, Martins A, Hsieh TJ, Seres A, Zupkó I. *In vivo* antidiabetic activity and quantitative determination of major active constituents of *Morus alba* leaf extract. 12th Eurasia Conference on Chemical Sciences, Korfu, Görögország, 2012. ápr. 16-21. Abstracts S₃-PP8*
14. Hunyadi A, Zupkó I, Balogh Á, Hsieh TJ, Veres K, Hohmann J. Mit ér az eperfalevél? Az antidiabetikus hatás vizsgálatának újabb eredményei. „Lehetőségek és korlátok a hazai flóra gyógynövényeinek kutatásában és hasznosításában”, az MGYT Gyógynövény Szakosztályának előadói ülése, Lajosmizse, 2010. szeptember 17.*