

Considerații asupra utilizării plantei *Humulus lupulus L.* ca agent estrogen

Considerations on the use of Humulus lupulus L. as an estrogenic agent

Lector Univ. Dr. Farm. Anca Daniela RAICIU¹, Daniel CORD¹, Alin FOCȘA²

¹Catedra de Farmacognozie, Fitochimie, Fitoterapie, Facultatea de Farmacie, Universitatea „Titu Maiorescu”, București

²Catedra de Chimie Farmaceutică, Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași

REZUMAT

Introducere. Hameiul (*Humulus lupulus L.*) este folosit ca materie primă esențială pentru fabricarea berii, dar posedă și o serie de proprietăți biologice. Fitoestrogenii prezenți în hamei prezintă un rol antioxidant, antiinflamator și probiotic, având efect în cazul osteoporozei și al diabetului, precum și în diminuarea efectelor vasomotorii (bufeuri) din perioada menopauzei.

Material și metodă. 8-prenilnaringenina a fost preparată conform unei modificări ale metodei inițiale. La o soluție răcită de naringenină s-a adăugat o soluție metanolică de metoxid de sodiu și bromură de prenil.

Rezultate și discuții. Efectul estrogenic a fost atribuit unor substanțe cum ar fi β -acizi, β -sitosterol, xanthohumol și desmetilxanthohumol. Investigațiile ulterioare au arătat că 8-prenilnaringenina este un principal estrogen din hamei. 8-prenilnaringenina acționează asupra receptorilor estrogenici α , ce mediază formarea osteoblastică osoasă și inhibă resorbția osoasă osteoclastică.

Cuvinte cheie: hamei, fitoestrogen, 8-prenilnaringenina, estrogen, antioxidant, receptor estrogenic

ABSTRACT

Introduction. Hops (*Humulus lupulus L.*) is used as a raw material for the production of beer but has also biological properties. Phytoestrogens present in the hops have an antioxidant, anti-inflammatory and probiotic role, while having an effect on the diseases of osteoporosis, diabetes and vasomotor effects (calf) during menopause.

Material and method. 8-prenilnaringenine was prepared according to a modification of the initial method. To a cooled solution of naringenin was added a methanolic sodium methoxide solution and prenyl bromide.

Results and discussions. The estrogenic effect has been attributed to substances such as β -acids, β -sitosterol, xanthohumol and desmethylxanthohumol. Further investigations have shown that 8-prenylnaringenine is a major hops estrogen. 8-prenilnaringenin acts on estrogen receptors that mediate bone osteoblastic formation and inhibit osteoclastic bone resorption.

Keywords: hops, phytoestrogen, 8-prenilnaringenine, estrogen, antioxidant, estrogen receptor

INTRODUCERE

Hameiul (*Humulus lupulus L.*) este folosit în principal ca materie primă esențială pentru fabri-

carea berii, dar se știe că planta posedă diferite proprietăți biologice (2). S-a izolat și identificat o flavanonă, (S) -8-prenilnaringenina (8-PN, Tabelul 1; 5,7,4'-trihidroxi-8-(3-metilbut-2-enil)

Adresă de corespondență:

Lector Univ. Dr. Farm. Anca Daniela Raiciu, Catedra de Farmacognozie, Fitochimie, Fitoterapie, Facultatea de Farmacie, Universitatea „Titu Maiorescu”, Bd. Gh. Șincai nr. 16, sector 4, București
e-mail: daniela_raiciu@yahoo.com

flavanonă), ca principal estrogen al hameiului (25). Folosind un biotest sensibil *in vitro* pe baza capacității compușilor estrogenici de stimulare a activității fosfatazei alcaline într-o linie celulară de adenocarcinom endometrial, s-a constatat că 8-PN este mai puternic decât oricare dintre cei mai bine cunoscuți fitoestrogeni ai izoflavonelor, cum ar fi genisteină și daidzeină, și flavonoid ale hameiului, incluzând isoxanthohumul și 6-prenilnaringenină (Tabelul 1). Această observație a fost confirmată de un biotest *in vitro* diferit utilizând o barieră de drojdie recombinantă care exprimă activitatea b-galactozidazei în virtutea receptorului de estrogen transferat în genom. Un suport suplimentar a fost oferit de către constatările recente privind activitatea *in vivo* a 8-PN utilizând un test acut bazat pe capacitatea estrogenilor de a induce o creștere rapidă a permeabilității vasculare uterine la șoareci ovariectomizați, precum și de stimulare a mitozelor în uter și vaginul șoarecilor experimentate prin administrarea de 8-PN în apa de băut (26).

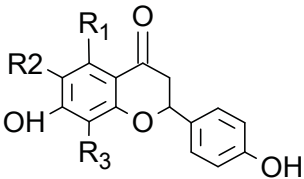
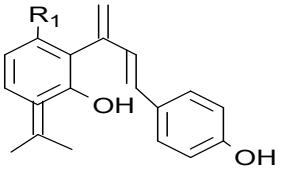
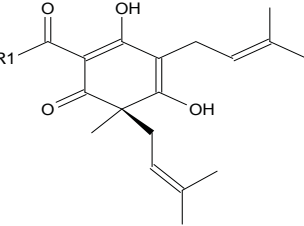
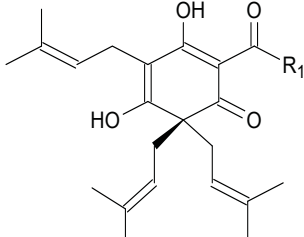
Fenselau și Talalay (1973) (9) au declarat că băile de nămol cu adaos de hamei se folosesc

pentru tratamentul afecțiunilor ginecologice. Referințele la utilizarea tradițională a hameiului în tratamentul acestor afecțiuni au fost identificate din SUA (3), Iran (28), România (23) și Franța (13) și există brevete privind utilizarea proprietăților estrogenice ale hameiului, în special pentru utilizarea externă în produsele cosmetice.

Literatura de specialitate subliniază efectele benefice ale fitoestrogenilor, precum reducerea aterosclerozei, osteoporozei, diabetului și efectelor vasomotorii (bufeuri) din perioada menopauzei, iar aceștia prezintă și rol antioxidant, antineoplazic, antiinflamator și probiotic. Pe de altă parte, efectele adverse constau în infertilitate demonstrată la animale, ceea ce indică afectarea funcției reproductive la om (1,6,8).

Pentru investigarea sistematică a acestei trăsături estrogenice în diferite părți morfologice ale hameiului și la diferite intervale de timp în timpul creșterii, trebuie să se dezvolte o metodă analitică sensibilă, selectivă și robustă. Scopul a fost, identificarea 8-PN în hamei. Experimentele preliminare au indicat faptul că matricele com-

TABELUL 1. Prenilizarea flavonoidelor și a acizilor din hamei

Structură	R ₁	R ₂	R ₃	Identificare	Peak
	OM _e	H	Prenil	Isoxanthohumul	1
	OH	H	Prenil	8-PN	2
	OH	Prenil	H	6-PN	4
	OH	-	-	Desemetilxanthohumul	3
	OMe	-	-	Xanthohumul	5
	CH(CH ₃) ₂	-	-	Cohumlonă	6
	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-	-	Humlonă	7
	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	-	-	Adhumlonă	8
	CH(CH ₃)CH ₂	-	-	Colupulonă	9
	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-	-	Luponă	10
	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	-	-	Adluponă	11

plexe nu au permis analiza selectivă a 8-PN prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu detectarea matricei cu diode ultraviolete (UV-DAD). Cantitatea adecvată de 8-PN, bazată pe separarea de bază, nu este simplă, în timp ce datele UV nu erau adecvate pentru identificarea componentelor de natură comparabilă. Studiile anterioare bazate pe GC-MS (5), testele radioimunologice (4) și MS/MS tandem (4) au necesitat derivatizarea, disponibilitatea anticorpilor și, respectiv, instrumentația excesivă.

MATERIAL ȘI METODĂ

8-prenilnaringenina (8-PN) a fost preparată conform unei modificări a metodei inițiale, publicată de către Zhao și colab. (15). La o soluție răcită de naringenină (5 g, 18,4 mmoli) în 250 ml metanol anhidru s-a adăugat o soluție metanolică de 30% metoxid de sodiu (60 ml) și bromură de prenil (9 ml, 96%, 78 mmoli), iar amestecul a fost refluxat timp de 3 ore. După îndepărtarea solventului, reziduul a fost tratat cu apă rece pe gheață și acidulat cu acid clorhidric diluat. Precipitatul s-a dizolvat în metanol și s-a supus cromatografiei. După spălare cu 50% metanol în apă, se colectează fracția eluată cu 75% metanol în apă, apoi se purifică prin HPLC semipreparativă utilizând solventul A (500 ppm acid formic în apă) și solventul B (5% acetonitril în metanol).

Materialul vegetal uscat din hamei (5 g) s-a extras, după degresare utilizând 150 ml izoctan, cu metanol/apă (3:1 v/v), sub atmosferă de azot (150 ml). Extractele combinate de apă metanol-apă au fost filtrate prin vată de sticlă, concentrată (30% și diluată la 50ml cu metanol-apă 1: 1 (v/v).

Metoda a fost adaptată dintr-un sistem de gradient raportat anterior pentru separarea extractelor de plante polifenolice (14), care conține apă conținând 1% acid formic (solvent A) și metanol conținând 5% acetonitril (solvent B). Adăugarea acidului formic permite o reținere mai puternică a polifenolilor, rezultând o rezoluție imediată și forme de vârf simetrice. Mai mult, volatilitatea relativă facilitează trecerea de la HPLC-UV-DAD la HPLC-MS. Procesul optimizat utilizează doar 500 ppm acid formic în apă (pH de 2,8) ca solvent A. Mai mult, solventul B a fost înlocuit cu acetonitril pentru selectivitate îmbunătățită și timpi de analiză mai scurți. Prin modificarea condițiilor HPLC-MS, s-a constatat că flavonoidele de hamei au fost ușor ionizate dacă faza mobilă conține acid formic. În consecință, analiza prin ESI (ionizare electrospray) și CI (ionizare chimică) s-a dovedit a fi simplă. Cu toate acestea, ESI părea să fie mai puțin critic decât CI și având o acțiune mai puternică atunci când acetonitrilul a fost aplicat în faza mobilă.

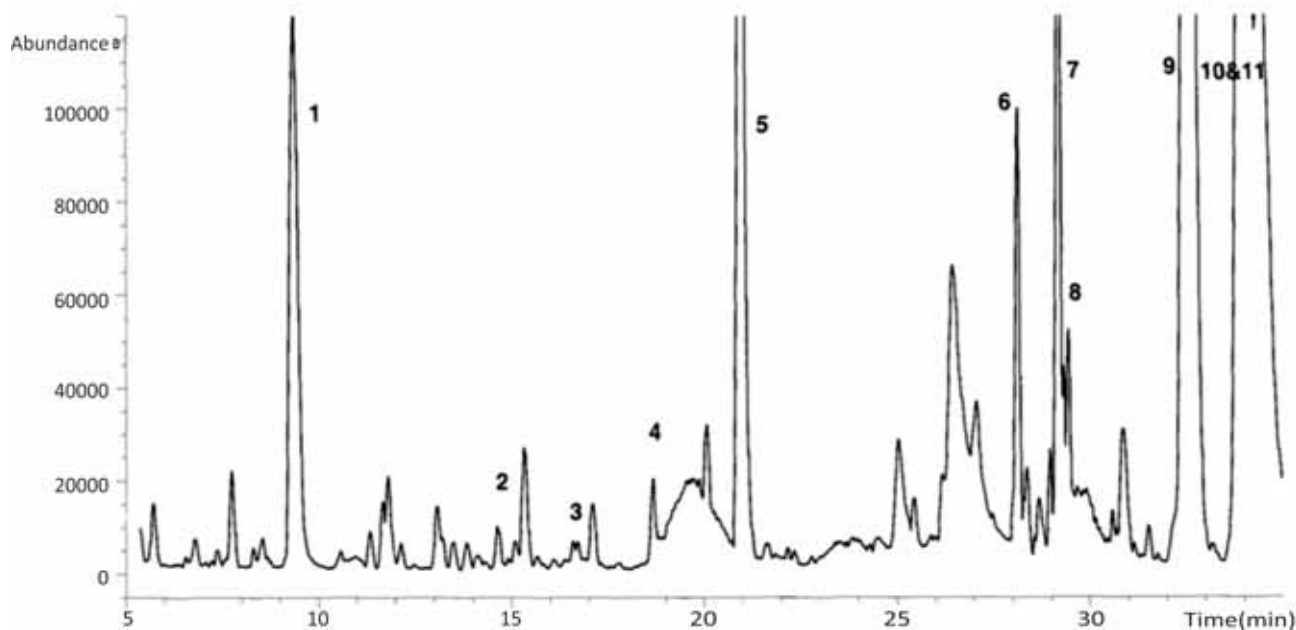


FIGURA 1. Cromatograma totală a flavonoizilor și a acizilor dintr-un extract de hamei (*Humulus lupulus L.*)

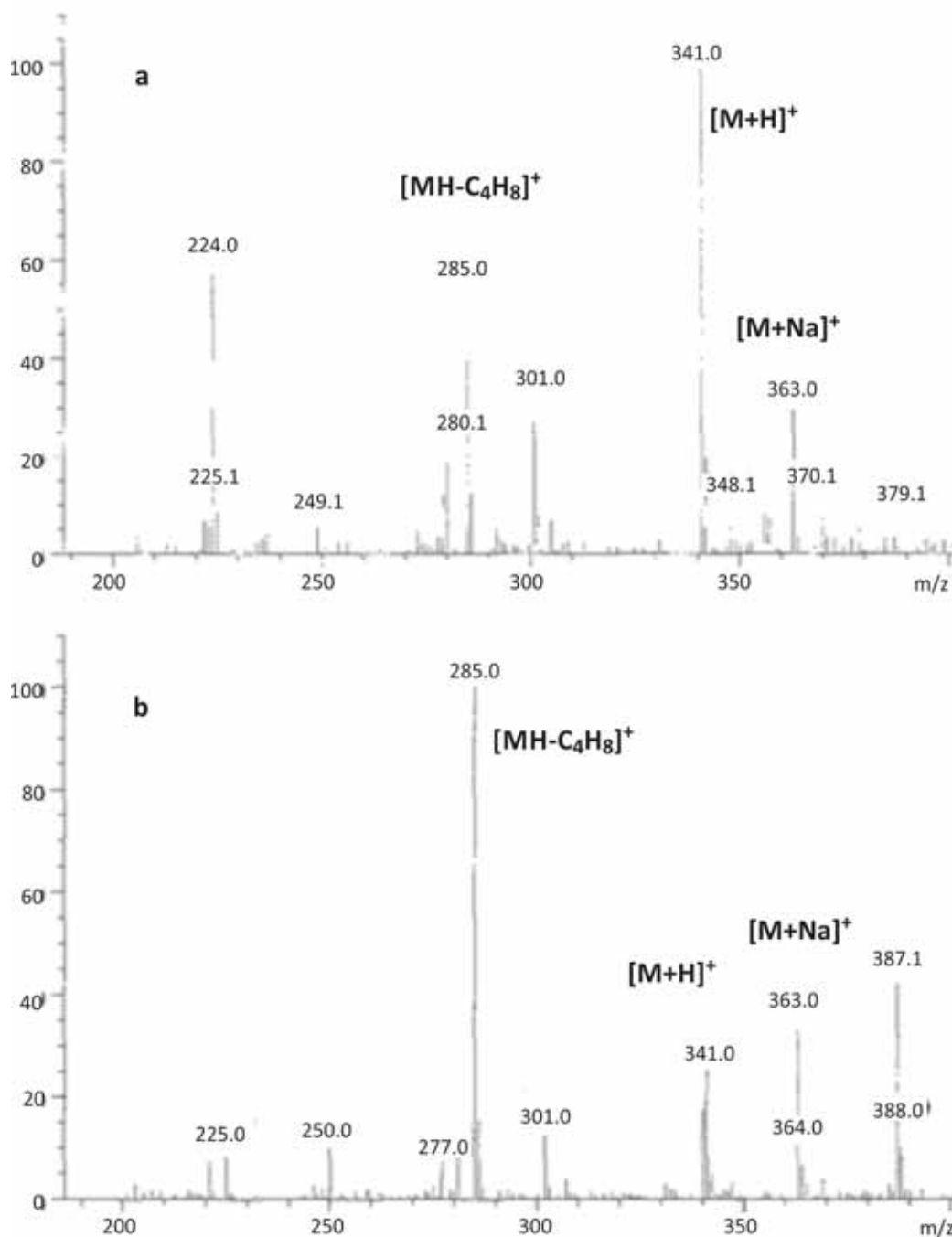


FIGURA 2. Spectrul de masă 8-prenilnaringenină (a) și 6-prenilnaringenină (b)

Fig. 1 prezintă cromatograma totală a ionilor unui extract de hamei care conține flavonoide de hamei prenilizate (peak-ul 1-5) și acizi. Acizii reprezintă un amestec de așa-numiții acizi alfa sau humuloni (cohumulon, humulon și adhumulon, peak-urile 6, 7 și, respectiv, 8) și a așa-numiților acizi beta sau lupulone (colupulone, lupulone și adlupulone; peak-ul 9, 10 și, respectiv, 11). Este important ca acești acizi, care sunt prezenți abundent în hamei, să fie bine separați de flavonoidele de hamei prenilare, care sunt constituenți minori, pentru a evita inferențele în ana-

lizele cantitative. Humulonele sunt precursori ai compușilor cu gustul amar în bere, lupulonele contribuie la activitatea bacteriostatică a hameiului.

Identificarea peak-urilor prezentată în Tabelul 1 se bazează pe informații obținute din fragmentările moleculare, care sunt facilitate de disocierea indusă de sursă în interiorul sursei (CID) și prin comparație cu datele cunoscute (11). Profilurile de fragmentare au fost deosebit de utile pentru caracterizarea izomerilor. De exemplu, ionul $(MH-C_4H_8)^+$ pare să fie predom-

minant atunci când restul prenil este adiacent la două grupe fenolice, de ex. m / z 285 în MS de 6-prenilnaringenină (6-PN) (Fig. 2b), în timp ce acest fragment este mai puțin abundent 8-PN (Fig. 2a).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Activitate estrogenică

Inițial, efectul estrogenic a fost atribuit unor substanțe precum β -acizi, β -sitosterol, xanthohumol și desmetilxanthohumol. Cu toate acestea, activitatea estrogenică nu a fost evidențiată prin metodele de testare biologice pentru xanthohumol, cât și pentru produsul de conversie izoxanthohumol, format în timpul fierberii, în procesul de fabricare a berii. Astfel, 8-prenilnaringenină este în prezent recunoscută ca fiind componentul estrogenic activ al hameiului. Prin testele *in vitro*, aceasta s-a dovedit a fi mai activă decât fitoestrogenii cunoscuți, precum cumestrolul sau genisteina (7).

Investigații ulterioare *in vitro* au arătat că 8-prenilnaringenină poate mima acțiunea 17β estradiolului cu o potență de 10 până la 20.000 ori mai scăzută (16).

Compusul 8-prenilnaringenină a fost identificat cu ajutorul unei expertize *in vivo*, cât și printr-un test *in vitro* pentru estrogeni. Astfel, biotestul fracționat al extractului de hamei a dus la identificarea compusului 8-prenilnaringenină, ca principal estrogen din hamei.

Utilizând diferiți compuși (xanthohumol, izoxanthohumol, 6-prenilnaringenină, 8-prenilnaringenină) ai unei fracții polifenolice din hamei s-a arătat că 8-prenilnaringenină este cel mai potent fitoestrogen, cu ajutorul unui biotest sensibil, bazat pe capacitatea compușilor estrogenici de a stimula fosfataza alcalină din celulele Ishikawa (8).

8-prenilnaringenină a fost identificată ca fiind unul dintre cei mai potenți fitoestrogeni, pe baza mai multor investigații *in vitro*. Acestea includ studii de legare de receptori, stimularea proliferării celulare estrogen-sensibile MCF-7 (liniile celulare ale adenocarcinomului mamar), inducția activității fosfatazei alcaline în linia celulară Ishikawa (20). De asemenea, această substanță este un ligand puternic pentru receptorii estrogenici α cu valoarea concentrației inhibitorii medii CI_{50} în domeniul nanomolecular și stimulează producția fosfatazei alcaline în celulele Ishikawa, precum și creșterea MCF-7 estrogen-dependente (liniile celulare de cancer mamar) (12).

Totodată, activitatea estrogenică a extractului alcoolic de hamei a fost demonstrată pe baza capacității de legare la receptorii $ER\alpha$ și $ER\beta$, inducerea activității fosfatazei alcaline în celulele Ishikawa (linia celulară epitelială umană a adenocarcinomului endometrial), sensibilizarea receptorilor progesteronului mARN în celulele Ishikawa, sensibilizarea presenelinei 2, o genă de estrogen inductibilă în celulele S30 (linia de celule de cancer de sân transfectate cu $ER\alpha$) (17).

Testele *in vivo* se bazează pe stimularea creșterii uterine la șobolanii imaturi sau ovariectomizați. Abilitatea acestor teste de a detecta activitate estrogenică scăzută este foarte dependentă de frecvența de administrare, rezultatele negative pot fi explicate de un regim de tratament inadecvat (18). 8-prenilnaringenină induce creștere uterină și suprimă pierderea osoasă la șobolanii ovariectomizați, atunci când le este administrată zilnic subcutanat o doză de 30 mg/kg corp (19). Astfel, după administrarea s.c. a unei doze de 30 mg/kg/zi de 8-prenilnaringenină, șobolanii au arătat un efect corespunzător unei doze de 0,01 mg/kg zi 17β estradiol. În consecință, compusul 8-prenilnaringenină s-a dovedit a fi mai puțin eficace decât 17β estradiol (19).

Studii recente realizate *in vivo* au demonstrat capacitatea 8-prenilnaringeninei de a reduce nivelurile de hormon luteinizant seric (LH) și hormon foliculostimulant (FSH), de a crește nivelul prolactinei serice și al greutatei uterine, de a induce hiperplazia epitelială și de a determina secreția glandelor mamare la șobolanii ovariectomizați, după un tratament de 3 luni cu o doză crescută (68,4 mg/kg). Aceste efecte asupra axei hipotalamo-hipofizo-uterine sunt asemănătoare cu cele provocate de estradiol (7).

În lipsa unor studii clinice, este contraindicată administrarea 8-prenilnaringeninei în sarcină și alăptare (27).

Activitate antiosteoporotică

Au fost raportate efecte ale 8-prenilnaringeninei asupra metabolismului osos (22). Compusul este identificat ca fiind reprezentativ pentru prenilflavonoide ca un puternic fitoestrogen, cu potențial în prevenirea osteoporozei (27).

Astfel, șobolanii ovariectomizați tratați cu 8-prenilnaringenină pentru 12 săptămâni au prezentat o îmbunătățire evidentă a caracteristicilor biomecanice și a densității minerale osoase (15, 22).

8-PN acționează asupra receptorilor estrogenici α , ce mediază formarea osteoblastică osoasă și inhibă resorbția osoasă osteoclastică. Astfel,

8-prenilnaringenina favorizează diferențierea și maturarea osteoblastelor MC3T3-E1 și inhibă direct macrofagele mononucleare RAW264.7, diferențierea osteoclastelor, resorbția osoasă și poate controla indirect osteoclastele prin reglarea expresiei și secreției OPG și RANKL (22).

8-PN are abilități semnificativ mai mari decât naringenina, prin activitatea osteogenică și inhibarea formării și funcției osteoclastelor, ceea ce indică că grupul prenil joacă un rol important în activitatea osteotrofică a compusului (10).

CONCLUZII

Hameiul (*Humulus lupulus L.*), folosit în principal ca materie primă importantă în fabricarea berii, posedă și unele acțiuni terapeutice, printre care și cele estrogenice.

S-a constatat că flavanona 8-prenilnaringenină (8-PN), component izolat și identificat prin

metode de analiză moderne, este recunoscută ca principal estrogen activ al hameiului.

Prin teste *in vitro* cu ajutorul unui biotest sensibil, bazat pe capacitatea compușilor estrogenici de a stimula fosfataza alcalină din celulele Ishikawa, s-a dovedit că 8-prenilnaringenina (8-PN) ar fi mai activ decât fitoestrogenii cunoscuți, precum coumestrolul și genisteina.

Testele *in vivo* pe animale de laborator, au evidențiat că, administrarea produsului 8-prenilnaringenină (8-PN) induce creșterea uterină și suprimă pierderea osoasă la șobolanii ovariectomizați.

Efectele componentului 8-prenilnaringenină (8-PN) asupra metabolismului osos demonstrează că este un puternic fitoestrogen, cu potențial în prevenirea osteoporozei.

8-prenilnaringenina (8-PN) mediază formarea osteoblastică osoasă și inhibă resorbția osoasă osteoclastică.

BIBLIOGRAFIE

- Cremoux P., This P., Leclercq G. et al.** Controversies concerning the use of phytoestrogens in menopause management: Bioavailability and metabolism. *Maturitas*, 2010, 65:334-339.
- D. De Keukeleire, S.R. Milligan, L. De Cooman, A. Heyerick, Pharm. Pharmacol. Lett.** 1997, 7, 83.
- Donsback, K.W.** Herbs Book No. 1. Institute for Natural Health Sciences, Huntington Beach, CA., 1977, 600
- E. Stevens, A.W. Taylor, M.L. Deinzer.** *J. Chromatogr. A*, 1999, 832, 97.
- E.R. Rosenblum, I.M. Campbell, D.H. Vanthiel, J.S. Gavalier.** *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 1992, 16, 843
- Erkkola R., Vervarcke S., Vanstulandt S.** A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over pilot study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts. *Phytomedicine*, 2010, 17(6):389-396.
- Faure S.** Traitements hormonaux substitutifs de la ménopause. *Actual Pharm* 2016; 55:57-71.
- Fenselau C., Talalay P.** Is oestrogenic activity present in hops? *Food Cosmet. Toxicol.* 11, 1973, 597-603.
- G. Charalambous, J.R.A. Pollock Ed.,** *Brewing Science Vol. 2*, Academic Press, London, 1991, 167.
- Gerhäuser C., Alt A.P., Klimo K. et al.** Isolation and potential cancer chemopreventive activities of phenolic compounds of beer. *Phytochem Rev.*, 2002; 1:369-377.
- Goetz P.** Traitement des bouffées de chaleur par insuffisance ovarienne par l'extrait de houblon (*Humulus lupulus*). *Rev. Phytother. Prat.* (issue 4), 1990, 13-15.
- H. Rong, J.E. Stevens; M.L. Deinzer, L. De Cooman, D. De Keukeleire,** *Planta Med.* 64, 1998, 620.
- Hümpel M., Isaksson P., Schaefer O. et al.** Tissue specificity of 8-prenylnaringenin: protection from ovariectomy induced bone loss with minimal trophic effects on the uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005, 97(3):299-305.
- Koetter U., Biendl M.** Hops (*Humulus lupulus*): A Review of its Historic and Medicinal Uses. *Herbal Gram*, 2010, 87: 44-57.
- Kretzschmar G., Zierau O., Wober J. et al.** Prenylation has a compound specific effect on the estrogenicity of naringenin and genistein. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 2010, 118:1-6.
- Luo D., Kang L., Ma Y. et al.** Effects and mechanisms of 8-prenylnaringenin on osteoblast MC3T3 and osteoclast-like cells RAW264.7. *Food Sci Nutr*, 2014, 2:341-350.
- Nelson H.D.** Menopause. *Lancet*, 2008, 371:760-770.
- Nikolic D., Li Y., Chadwick L.R. et al.,** Metabolism of 8-prenylnaringenin a potent phytoestrogen from hops (*Humulus lupulus*) by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.*, 2004, 32:272-279.
- O. Lapcik, M. Hill, R. Hampl, K. Wgihdl, H. Adlercreutz.** *Steroids* 63, 1998, 14.
- Possemiers S., Bolca S., Grootaert C. et al.** The prenylflavonoid isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus L.*) is activated into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin *in vitro* and in the human intestine. *J Nutr*, 2006, 136:1862-1867.
- Racz G., Fazakas B., Racz-Kotilla E.** Trichomonazide und anthelmintische Wirkung in der rumänischen Volksmedizin verwendeten Pflanzen. *Planta Med.* 39, 1980, 257.
- S.R. Milligan, J.C. Kalita.** King's College London, unpublished results, 1999, 22-25
- S.R. Milligan, J.C. Kalita, A. Heyerick, H. Rong, L. De Cooman, D. De Keukeleire,** *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 1999, 2249-9. King's College Londlts (1999).
- Shah B.N., Panchal M.A., Gohil N. et al.** Phyto-Pharmacological profile of *Humulus lupulus*. *Pharmacologyonline* 2010; 1:719-736.
- Solak K.A., Santos R.R., van den Berg M. et al.** Naringenin (NAR) and 8-prenylnaringenin (8-PN) reduce the developmental competence of porcine oocytes *in vitro*. *Reprod Toxicol*, 2014; 49:1-11
- Zagari A.** Medicinal Plants, fifth ed. *Tehran University Publications, Tehran, Iran.* 1992, 969-973
- Zhao X., Bu Y. Li.** *Bull. Soc. Chim. Belges* 104, 1995, 119.