



Bruckner-termi előadás

Vasas Andrea

■ SZTE Farmakognóziai Intézet

Ez csak természetes!

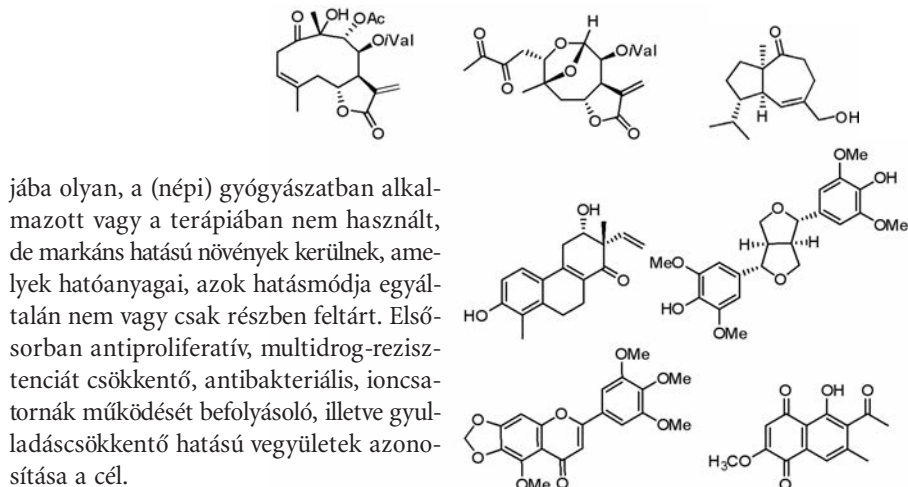
Biológiailag aktív szekunder metabolitok izolálása és szerkezetmeghatározása

A természetes eredetű vegyületek gyógyászatban betöltött jelentős szerepe senki számára sem kétséges. A növények szekunder metabolitjai olyan fontos gyógyszer-családok alapjául szolgáltak, mint például a fájdalomcsillapítók (morfin), görcsoldók (papaverin), maláriaellenes szerek (kinin, artemizinin), perifériás izomrelaxánsok (kuráre), koleszterinszint-csökkentők (sztatinok) vagy a biguanid típusú antidiabetikumok (galegin).

A növényi és egyéb természetes eredetű vegyületek a gyógyszerkutatásban napjainkban is jelentős szerepet kapnak. A modern gyógyszervegyületek jelentős része ma is természetes eredetű vagy természetes vegyületekkel rokon (**1. ábra**) [1].

A természetesanyag-kutatás a kombinatorikus kémiához viszonyítva számos előnnyel rendelkezik, melyek közül kiemelhető: 1) a növényi anyagok szerkezeti sokszínűsége; 2) a hatásos anyagok jobb találati aránya; 3) az aktív anyagok keresését etnofarmakológiai ismeretek is támogatják; 4) a növények, mikroorganizmusok és egyéb élőlények vizsgáltsága rendkívül alacsony. Természetesen vannak a kutatásnak nehézségei is, köztük például az alacsony produktivitás, a kivonatok komplexitása és az ebből adódó fals pozitív találatok, a komponensek interakciója és alacsony koncentrációja, a bonyolult szerkezetek, ami megnehezíti a kémiai szintézisüket, illetve az, hogy a vegyületek méretnövelt előállítására nehezen megoldható.

Az SZTE Farmakognóziai Intézetében végzett növénykémiai kutatások célpont-



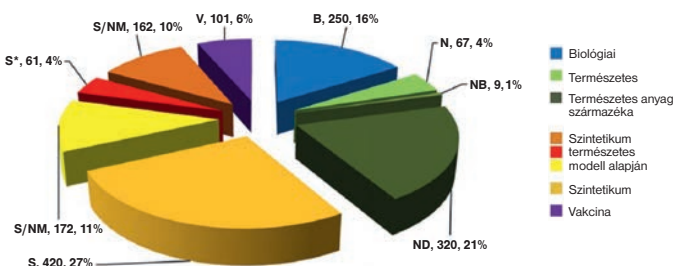
jába olyan, a (népi) gyógyászatban alkalmazott vagy a terápiában nem használt, de markáns hatású növények kerülnek, amelyek hatóanyagai, azok hatásmódja egyáltalán nem vagy csak részben feltárt. Elsősorban antiproliferatív, multihidrog-rezisztenciát csökkentő, antibakteriális, ioncsatornák működését befolyásoló, illetve gyulladáscsökkentő hatású vegyületek azonosítása a cél.

A vizsgálatra szánt növényfajok kiválasztása sok esetben farmakológiai szűrővizsgálatok alapján történik, melynek során a begyűjtött mintákat először – lehetőség szerint – szervekre bontjuk, majd metanollal extraháljuk. A betöményített kivonatokat vízzel elegyítjük, majd különböző polaritású oldószerekkel (*n*-hexán, kloroform, etil-acetát) folyadék–folyadék megosztást végzünk, és vizsgáljuk az így nyert frakciók biológiai aktivitását különböző tesztrendszeren. Az elmúlt 15 évben az Euphorbiaceae, Asteraceae, Polygonaceae és Juncaceae család közel 100 fajának 500 frakcióját analizáltuk, melyet a szűrővizsgálatokban aktívnak mutató fajok preparatív feldolgozása követett.

2. ábra. Néhány izolált vegyület szerkezete

tén hasonló metodika szerint történik. A kivonást, majd folyadék–folyadék megosztást követően a fitokémiai és farmakológiai szempontból legígéretesebb frakciókat tisztítjuk tovább kromatográfiai módszerek [oszlopkromatográfia (VLC, MPLC, HPLC, gél) és rétegekromatográfia (RPC, TLC, prep. TLC)] kombinált alkalmazásával. Az így nyert vegyületek szerkezetét spektroszkópiai módszerek (MS, NMR) segítségével határozzuk meg. Néhány anyag esetén HPLC–ECD mérésekkel és kvantummechanikai számításokkal az abszolút konfiguráció meghatározására is sor került.

Az izolált komponensek között szeszkvi-, di- és triterpének, lignánok, flavonoidok, fenantrének és naftalének egyaránt megtalálhatók (**2. ábra**). Új vegyületek keresésének a találati aránya a kutyatej fajok esetén a legmagasabb (kb. 75%), a fajok nagy számban szolgáltatnak új, korábban nem ismert diterpéneket (**3. ábra**) [2]. Amennyiben a vegyületeket (esulatin A, junkuenin B és lobatin B) jelentős mennyiségben (0,5–1 g) izoláljuk, lehetőség nyílik félszintetikus átalakításokra, illetve a le-



1. ábra. Az 1981 és 2014 között forgalomba hozott gyógyszerek (n = 1562) eredet szerinti megoszlása



hetséges bioszintetikus utak tanulmányozására.

Az ingenol-mebutátot, amely a Picato nevű gyógyszer hatóanyaga, 2012-ben engedélyezte először az FDA, majd az EMA az aktinikus keratózis, egy rákmegelőző bőrelváltozás kezelésére. Különlegessége, hogy szerkezetmódosítás nélkül vált gyógyszerre és az anyanövényből (*Euphorbia pepus*) elsőként munkacsoportunk izolálta.

Farmakológiai vizsgálatok

Antiproliferatív hatás

Az izolált vegyületek antiproliferatív hatását humán tumoros sejtvonalakon [cervix-karcinóma (HeLa), epiteliális eredetű bőrkarcinóma (A431), emlőkarcinóma (MCF7), petefészek-karcinóma (A2780), és endometriális adenokarcinóma (Ishikawa)] vizsgáltuk MTT teszt alkalmazásával, 10 és 30 µg/ml koncentrációban. Pozitív kontrollként doxorubicin és ciszplatin szolgált.

Több, különböző alapvázal rendelkező vegyület (*Euphorbia* fajokból izolált diterpének és a *Neurolaena lobatából* nyert szeszkviterpének) esetén is magas sejtnövekedés-gátló hatást tapasztaltunk, egy vagy akár valamennyi sejtvonalon. Az IC₅₀ értékek sok esetben összemérhetőek voltak a referencia anyagával [3].

Multidrog-rezisztenciát csökkentő hatás

Ilyen hatású vegyületek keresése azért nagyon fontos napjainkban, mert a daganas betegségekben alkalmazott kemoterápiás kezelések egyik fő problémája a rákos sejtek gyógyszerekkel szemben kialakuló rezisztenciája. Ez a rezisztencia akár egyetlen kemoterápiás szerrel történő kezelés után kialakul, és hatására a tumorsejt egyszerre több, kémiailag hasonló gyógyszerre válik rezisztenssé. A multidrog-rezisztencia oka egy membránprotein, a P-glikoprotein hatására bekövetkező fokozott gyógyszerkiáramlás a sejtből.

Vizsgálataink során megfigyeltük, hogy számos izolált *Euphorbia*-diterpén (jatro-

fán-, pre- és ciklomirzinán-vázis vegyületek) a pozitív kontroll verapamil hatását többszörösen meghaladó mértékben növelte a tumorsejtek gyógyszer-akkumulációját a permeabilitási glikoprotein efflux-pumpa tevékenységének gátlásával [3, 4].

Antibakteriális hatás

A Juncaceae fajok antibakteriális hatásának vizsgálata 10 multirezisztens baktériumtörzsen, korongdiffúziós módszerrel történt, melynek során megállapítottuk, hogy több faj kivonata gátolta a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* szaporodását. A további farmakológiai vizsgálatra kiválasztott leghatásosabb növényből, a *Juncus inflexus*ból izolált fenantrének közül négy mutatott jelentős anti-MRSA aktivitást, melyeknek aztán mikrodilúciós módszerrel meghatároztuk a MIC értékét [5].

Gyulladáscsökkentő hatás

A gyulladáscsökkentő hatás vizsgálata két tesztszisztemen történt. A *N. lobatából* izolált szeszkviterpének 10 µM koncentrációban a monocita és endotél sejtek lipopoliszacharid, illetve tumor nekrozis faktor α (TNF-α) által indukált IL-8 és E-szelektin elválasztását egyaránt gátolták [6]. A *Luzula luzuloides*ből azonosított fenantrének, illetve flavonoidok gyulladáscsökkentő aktivitását pedig fMLP/CB-indukált humán neutrofil sejteken igazoltuk [7].

Ioncsatornák működését befolyásoló hatás

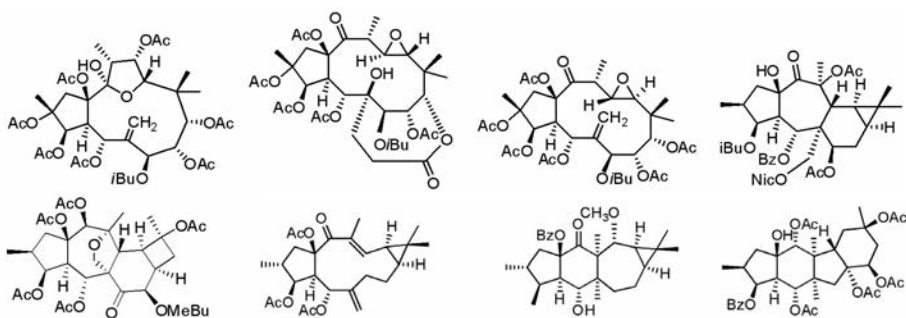
A pitvarfibrilláció gyakori szívritmuszavar. Közvetett módon az életet veszélyeztető megbetegedés, mivel gyakori szövődménye a kamrafibrilláció és az agyi embólia. Jelenleg a kezelésére nem áll rendelkezésre kellően hatékony és biztonságos antiaritmiás gyógyszer. A G-fehérje kapcsolt, befelé egyenirányító kálium-ioncsatornák (GIRK) elsősorban a pitvarokban expresszálódnak, és azok a vegyületek, melyek ezt a csatornát szelektíven gátolják, a krónikus pitvarfibrilláció kezelésében lehetnének hatásos szerek.

A vizsgálatok során a mérés embrionális vese-sejtvonalon történt patch clamp módszerrel, propafenon referencia anyag mellett. Az *E. falcatából* izolált mirzinán, ciklo- és premirzinán típusú diterpének közül 13 mutatott jelentős (61–83%) GIRK-gátló hatást 10 µM koncentrációban, és közülük 5 alacsony hERG aktivitással rendelkezett [8]. Ezek a vegyületek szelektív GIRK-hatásuknak köszönhetően ígéretes jelöltek lehetnek további farmakológiai vizsgálatokban.

Összefoglalás

Munkánk során több mint 130 vegyületet, köztük közel 60 új, természetes anyagot izoláltunk, melyek közül számos rendelkezik a további kutatások számára perspektivikus biológiai aktivitással. A modern elválasztástechnikai és szerkezetvizsgáló módszerek elterjedésével egyre több természetes anyag azonosítása válik lehetővé, ami folyamatos inspirációt nyújt a szintetikus kémia és a gyógyszerkutatás számára. Az egyes vegyületsorozatok farmakológiai hatásának vizsgálata szerkezet-hatás összefüggések levezetésének alapját képezheti. Az LC–MS vizsgálatokkal lehetőség nyílik a hatásos vegyületek különböző növényekben, kivonatokban történő gyors azonosítására, célzott keresésére. Ezenkívül az izolált anyagok alapján megerősíthető a fajok botanikai rokonsága, illetve a kémiai összetétel lehetővé teheti a botanikailag kérdéses fajok rendszerbe történő beillesztését. A kutatás további lehetséges iránya a fajokkal szimbiózisban élő endofita gombák és azok metabolitjainak tanulmányozása, illetve a különböző környezeti és talajviszonyok hatása a másodlagos anyagcseretermékek szintézisére.

3. ábra. Néhány izolált *Euphorbia*-diterpén szerkezete



IRODALOM

- [1] Newman, D. J.; Cragg, G. M., *J Nat Prod* (2016) 79, 629.
- [2] Vasas, A.; Rédei, D.; Csupor, D.; Molnár, J.; Hohmann, J., *Eur J Org Chem* (2012) 5115.
- [3] Vasas, A.; Sulyok, E.; Rédei, D.; Forgo, P.; Szabó, P.; Zupkó, I.; Berényi, Á.; Molnár, J.; Hohmann, J., *J Nat Prod* (2011) 74, 1453.
- [4] Vasas, A.; Sulyok, E.; Martins, A.; Rédei, D.; Forgo, P.; Kele, Z.; Zupkó, I.; Molnár, J.; Pinke, G.; Hohmann, J., *Tetrahedron* (2012) 68, 1280.
- [5] Tóth, B.; Liktor-Busa, E.; Kúsz, N.; Szappanos, Á.; Mándi, A.; Kurtán, T.; Urbán, E.; Hohmann, J.; Chang, F. R.; Vasas, A., *J Nat Prod* (2016) 79, 2814.
- [6] McKinnon, R.; Binder, M.; Zupko, I.; Afonyushkin, T.; Lajter, I.; Vasas, A.; de Martin, R.; Unger, C.; Dolznig, H.; Diaz, R.; Frisch, R.; Passreiter, C. M.; Krupitza, G.; Hohmann, J.; Kopp, B.; Bochkov, V. N., *Phytomedicine* (2014) 21, 1695.
- [7] Tóth, B.; Chang, F. R.; Hwang, T. L.; Szappanos, Á.; Mándi, A.; Hunyadi, A.; Kurtán, T.; Jakab, G.; Hohmann, J.; Vasas, A., *Fitoterapia* (2017) 116, 131.
- [8] Vasas, A.; Forgo, P.; Orvos, P.; Tóth, L.; Csorba, A.; Pinke, G.; Hohmann, J., *J Nat Prod* (2016) 79, 1990.