

MAGYARORSZÁGI *CENTAUREA* FAJOK

BIOLÓGIAILAG AKTÍV VEGYÜLETEINEK VIZSGÁLATA

Szakmai beszámoló a PD 71724 OTKA pályázathoz

Dr. Csupor Dezső egyetemi adjunktus

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Farmakognóziai Intézet

1

A *Centaurea sadleriana* Janka Magyarországon őshonos, kizárólag a Kárpát-medencében előforduló faj. Föld feletti részéből készített főzetét tradicionálisan alkalmazzák haszonállatok sebeinek gyógyítására a Dél-Alföldön. Ezt a népi gyógynövény-alkalmazást elsőként kutatócsoportunk írta le. Jelen munka célja a *C. sadleriana* fitokémiai és farmakológiai vizsgálata, valamint a rokon fajok tanulmányozása volt a hasonló célú felhasználás szempontjából. A pályázat munkatervében vállalt feladatokat az alábbiak szerint teljesítettem:

1. NÖVÉNYI MINTÁK BEGYŰJTÉSE

A *C. sadleriana* föld feletti részének mintáját részletes fitokémiai vizsgálat céljára begyűjtöttem.

Tizenkét, a Kárpát-medencében előforduló, honos, illetve termesztett *Centaurea* faj (*C. macrocephala*, *C. bracteata*, *C. indurata*, *C. nigrescens*, *C. ruthenica*, *C. adjarica*, *C. arenaria*, *C. jacea*, *C. cyanoides*, *C. melitensis*, *C. cataonica*, *C. dealbata*) mintáját gyulladáscsökkentő hatásra irányuló *in vitro* szűrővizsgálat céljára begyűjtöttem.



C. sadleriana Janka

2. FITOKÉMIAI VIZSGÁLAT

A *Centaurea sadleriana* minta fitokémiai vizsgálata lezárult. A növény metanollal történő extrakcióját követően a betöményített és vízzel hígított kivonatot *n*-hexánnal és kloroformmal történő folyadék-folyadék megosztással frakcionáltam. A hexánnal és kloroformmal nyert frakciók folyadékkromatográfiás elválasztása során nyert 13-13 frakció kromatográfiás tisztítása megtörtént (oszlopkromatográfia, vákuum-folyadékkromatográfia, centrifugális planárokromatográfia, MPLC, HPLC, preparatív rétegekromatográfia). Ennek eredményeként 18 tiszta vegyületet izoláltam, amelyek közül 12 szerkezetét NMR és HR-MS módszerek segítségével határoztam meg. Az azonosított vegyületek közé tartozik a pektolinarigenin, a szalvigenin, a hispidulin, a krizoeriol, az apigenin, a luteolin (flavonoidok), a gamma- és alfa-linolénsav, a béta-szitoszterin, a sztigmaszterin és a kampeszterin, valamint a vanillin. További 6 vegyület szerkezetének felderítése folyamatban van.

A tizenkét begyűjtött *Centaurea* faj mintáinak frakcionált kivonása *in vitro* gyulladáscsökkentő vizsgálatra megtörtént. Ugyanezekkel a fajokkal (a pályázatban nem vállalt) a polifenolos vegyületekre vonatkozó összehasonlító kémiai elemzés folyamatban van.

3. FARMAKOLÓGIAI VIZSGÁLAT

3.1. GYULLADÁSCSÖKKENTŐ HATÁS *IN VITRO* VIZSGÁLATA

A kivonatok *in vitro* gyulladáscsökkentő hatását COX-1, COX-2 és 5-LOX enzimgátláson alapuló tesztek segítségével vizsgáltuk, zileuton (10 μ M, 5-LOX), indometacin (0,9 μ M, COX-1) és NS-398 (2,6 μ M, COX-2) pozitív kontrollok alkalmazásával.-A *C. sadleriana* kivonatai (CSE-1: vizes kivonat; CSE-2: metanolos kivonat; CSE-3: metanolos kivonatból *n*-hexános folyadék-folyadék megosztással nyert frakció; CSE-4: metanolos kivonatból kloroformos folyadék-folyadék megosztással nyert frakció) 50 μ g/ml koncentrációban *in vitro* jelentős COX-1, COX-2 és 5-LOX enzimgátló hatást mutattak (**1. táblázat**).

1. táblázat *C. sadleriana* kivonatainak *in vitro* enzimgátló hatása

Kivonat	COX-1 gátlás (%)	COX-2 gátlás (%)	5-LOX gátlás (%)
CSE-1	-40,33 $\pm$ 5,65	-23,58 $\pm$ 11,97	-29,21 $\pm$ 10,38
CSE-2	-5,43 $\pm$ 11,73	25,11 $\pm$ 3,45	-10,99 $\pm$ 14,27
CSE-3	80,71 $\pm$ 4,56	90,39 $\pm$ 2,94	53,23 $\pm$ 6,29
CSE-4	76,09 $\pm$ 6,65	86,92 $\pm$ 5,66	47,49 $\pm$ 9,30

A *C. sadleriana* kivonatából nyert *n*-hexános kivonatok frakcióinak *in vitro* gyulladáscsökkentő hatásra (COX-1, COX-2 és 5-LOX enzimgátló aktivitás) irányuló szűrővizsgálata megtörtént (**2. táblázat**). A vizsgálatok igazolták az előzetesen a növény nyers kivonata esetén tapasztalt gyulladáscsökkentő hatást és a kromatográfiás elválasztás sikerességét, a frakciók egy része ugyanis kiemelkedő aktivitást mutatott, mások viszont inaktívak voltak. Több frakció esetén kimagasló hatásosság volt megfigyelhető. A COX-1 gátló hatásra vizsgált 13 kivonatból 6, COX-2 gátló hatást tekintve 6, 5-LOX gátló hatást illetően 6 frakció esetén volt megfigyelhető 60%-osnál nagyobb gátlás. A kloroformos frakciók esetén nem volt tapasztalható 60%-ot elérő aktivitás. A szűrővizsgálatok eredményeinek ismeretében a további kromatográfiás feldolgozás elsősorban a kiemelkedő aktivitású frakciókra irányult. Mivel az izolált vegyületek gyulladáscsökkentő hatása az irodalomban ismert, ilyen jellegű vizsgálatukra nem került sor.

2. táblázat *C. sadleriana* kivonatfrakciók *in vitro* enzimgátló hatása

Frakció	COX-1 gátlás (%)		COX-2 gátlás (%)		5-LOX gátlás (%)	
	átlag	SD	átlag	SD	átlag	SD
CS-H-I	-7,02	7,06	-16,68	20,60	14,82	1,29
CS-H-II	54,38	5,25	83,86	3,66	12,02	7,46
CS-H-III	5,62	6,25	3,90	20,34	-16,14	41,14
CS-H-IV	59,61	9,44	79,53	8,09	86,58	9,13
CS-H-V	71,18	3,97	92,18	3,18	85,86	17,68
CS-H-VI	66,42	11,32	87,12	13,12	80,52	8,99
CS-H-VII	82,45	8,41			75,88	7,90
CS-H-VIII	83,31	6,44			71,68	11,72
CS-H-IX	61,30	3,73	80,35	7,02	70,16	7,43
CS-H-X	32,10	7,29	23,43	11,47	52,18	16,54
CS-H-XI	13,88	11,12	70,52	2,19	48,24	22,79
CS-H-XII	10,54	9,67	52,34	6,97	48,20	11,01
CS-H-XIII	12,29	12,80			38,56	20,95
pozitív kontroll	44,56	10,29	62,70	2,47	71,16	8,11

A 12 további begyűjtött *Centaurea* faj közül a *C. macrocephala*, *C. bracteata*, *C. indurata*, *C. nigrescens*, *C. ruthenica*, *C. adjarica*, *C. cyanoides*, *C. melitensis*, *C. cataonica*, *C. dealbata* kivonatainak *in vitro* gyulladáscsökkentő vizsgálata lezárult (**3. táblázat**). A felsorolt fajok föld feletti részének *n*-hexánnal (A frakció), kloroformmal (B frakció), metanollal (C frakció) és vízzel (D frakció) készült kivonatainak hatását vizsgáltuk COX-1 és COX-2 enzimeken, 50 µg/ml koncentrációban. A növények *n*-hexános kivonatai esetén a *C. sadleriana* esetén tapasztalhoz hasonló mértékű enzimgátló hatást tapasztaltunk. A *C. jacea* és *C. arenaria* kivonatainak *in vitro* gyulladáscsökkentő vizsgálata folyamatban van.

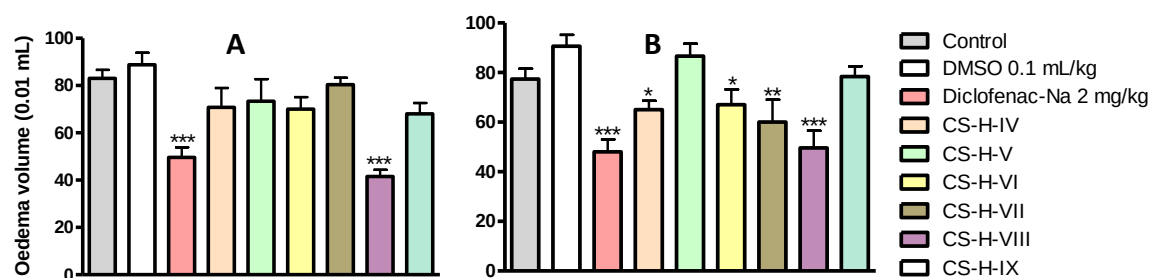
3. táblázat *Centaurea* fajok kivonatfrakcióinak *in vitro* enzimgátló hatása

Faj		A frakció		B frakció		C frakció		D frakció	
		Gátlás %	SD	Gátlás %	SD	Gátlás %	SD	Gátlás %	SD
<i>C. adjarica</i>	COX-1	68,76	5,53	27,06	10.11	-23.82	22.79	-17.52	15.60
	COX-2	71,00	2,14	35,34	4.54	-4.21	10.64	6.91	13.99
<i>C. bracteata</i>	COX-1	67,81	5,78	24,52	11.20	-7.42	11.37	-17.53	12.39
	COX-2	60,79	18,69	21,61	19.14	-28.41	23.09	-25.36	26.19
<i>C. cataonica</i>	COX-1	65,72	11,05	-0,28	28.17	-2.70	6.46	-24.26	20.07
	COX-2	68,49	11,35	10,82	14.43	6.53	6.08	0.76	10.96
<i>C. cyanoides</i>	COX-1	66,01	3,13	10,71	16.27	-21.06	12.56	-18.27	8.72
	COX-2	68,68	2,91	17,97	8.71	0.66	5.98	2.44	8.38
<i>C. dealbata</i>	COX-1	69,39	8,58	22,15	9.34	-27.41	20.55	-54.99	24.09
	COX-2	61,63	7,01	24,69	8.86	3.30	12.61	-6.13	11.23
<i>C. indurata</i>	COX-1	71,84	7,31	23,36	5.81	-20.86	22.27	-5.90	8.29
	COX-2	71,10	3,22	38,87	13.23	-13.11	7.87	10.66	7.55
<i>C. macrocephala</i>	COX-1	74,73	5,71	25,60	14.61	-23.39	8.05	-26.57	15.86
	COX-2	77,00	3,18	22,87	6.58	6.40	10.66	-0.28	10.37
<i>C. melitensis</i>	COX-1	53,50	10,49	5,88	6.72	-8.81	11.29	-10.48	6.83
	COX-2	71,82	11,53	18,78	8.25	0.83	7.61	-0.51	6.00
<i>C. nigrescens</i>	COX-1	72,77	7,54	24,17	16.44	-2.17	10.25	5.90	6.85
	COX-2	78,51	6,66	44,77	10.02	4.05	10.28	9.12	7.37
<i>C. ruthenica</i>	COX-1	69,34	5,33	9,74	5.75	3.08	6.83	-5.71	9.67
	COX-2	78,27	7,47	18,37	6.90	6.53	6.08	4.24	6.34

3.2 GYULLADÁSCSÖKKENTŐ HATÁS *IN VIVO* VIZSGÁLATA

Az *in vitro* gyulladáscsökkentő hatásra irányuló vizsgálatban kimagasló aktivitású *C. sadleriana* kivonatfrakciók *in vivo* gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálatát elvégeztük. A vizsgálatokat hím Sprague-Dawley patkányokon, a kivonat egyszeri adagolásával *per os* vagy parenterális adagolásával végeztük carrageenan-indukált gyulladással modell alkalmazásával. Orális adagolás mellett egy, intraperitoneális adminisztráció esetén 4 kivonatfrakció mutatott a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns, az aktív kontroll diclofenachhoz hasonló intenzitású gyulladáscsökkentő hatást (**1. ábra**). Ezen eredményeket figyelembe vettük a kivonatok

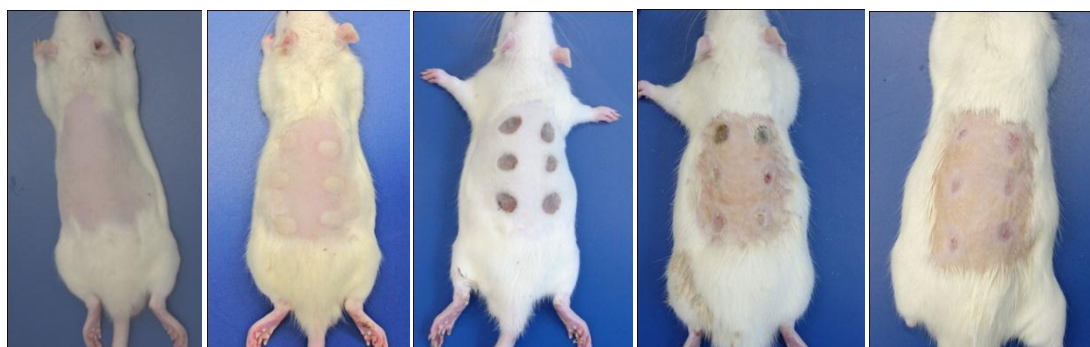
további kromatográfiás tisztításánál. Az izolált vegyületek kis mennyisége nem tette lehetővé hatásuk *in vivo* tanulmányozását.



1. ábra *Centaurea sadleriana* kivonatok gyulladáscsökkentő hatása orális (A) (25 mg/kg) és intraperitoneális (B) (5 mg/kg) adagolás esetén

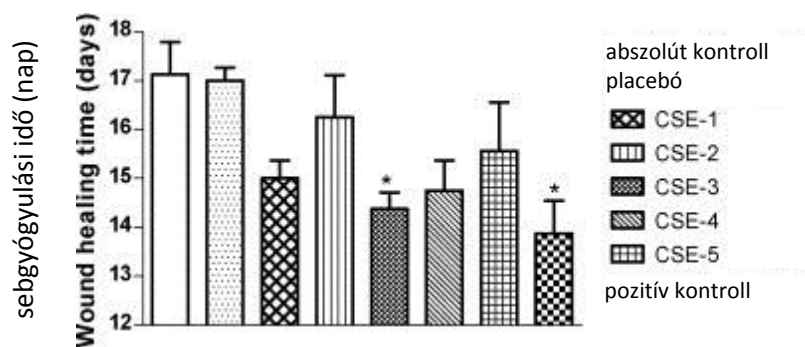
3.2. SEBGYÓGYULÁST ELŐSEGÍTŐ HATÁS *IN VIVO* VIZSGÁLATA

A sebgyógyulást elősegítő hatás *in vivo* vizsgálata során 5 frakció hatásosságát tanulmányoztuk: a *C. sadleriana* metanolos kivonatának folyadék-folyadék megosztásával nyert *n*-hexános és kloroformos frakciót, az eredeti és a kizárás után visszamaradó metanolos kivonatot, illetve a növény forró vizes kivonatát. A növényből izolált vegyületek kis mennyisége nem tette lehetővé hatásuk *in vivo* tanulmányozását. A kivonatokat Carbomer gélben szuszpendálva alkalmaztuk. A vizsgálatot nőstény Sprague-Dawley patkányokon végeztük (csoportonként 8 állat). A vizsgálat során az állatok hátán hőhatással előidézett sebeket (állatonként 6, standard méretű seb) kezeltük a vizsgált kivonatokat tartalmazó készítményekkel. A hatásosságot a sebek felének leeséséig eltelt idővel mértük.



2. ábra Kísérleti állat seb előidézése előtt, közvetlenül égetés után, majd a sebgyógyulás stádiumai

A kezelés hatásosságát kezelésben nem részesült (abszolút kontroll), placebóval (a gél vivőanyaga) kezelt, illetve aktív kontrollal (szalicilsavat tartalmazó gél) kezelt állatokhoz hasonlítottuk. Mindegyik növényi kivonat gyorsította a sebgyógyulást az abszolút kontrollhoz és a placebóhoz viszonyítva, statisztikailag szignifikáns (az aktív kontrollal összevethető) hatásosság az *n*-hexános frakció esetén volt megfigyelhető. A sebek felének leeséséig eltelt idő az abszolút kontrollcsoportban átlagosan 17,2 nap, a placebókezelést kapott csoportban 16,5 nap, a hexános frakcióval kezelt csoportban 14,4 nap volt. A növény vizes kivonata esetén (ehhez hasonló extraktumot alkalmaznak a népi gyógyászatban) jelentős gyógyulási idő rövidülés (>2 nap) volt megfigyelhető (**3. ábra**). Ezen eredményeket figyelembe vettük a kivonatok további kromatográfiás tisztításánál.



3. ábra A *Centaurea* kivonatok hatása a sebgyógyulásra ($p < 0.05$ a placebóhoz viszonyítva)

4. ÖSSZEFOGLALÁS

Az munkatervben vállalt feladatok teljesítése a tervek szerint megtörtént. Eredményeink igazolják a *C. sadleriana* népi gyógyászatban megfigyelt sebgyógyulást gyorsító hatását, és a növényből kiemelkedő gyulladáscsökkentő aktivitású frakciókat is azonosítottunk. A növény kivonatából több gyulladáscsökkentő hatású vegyületet izoláltunk. A *C. sadleriana* fitokémiai, valamint *in vitro* és *in vivo* gyulladáscsökkentő és sebgyógyulást elősegítő hatásra történő vizsgálata lezárult. Eredményeimről 3 tudományos közleményben (ebből 2 közlés alatt) és 4 konferenciaelőadásban számoltam be.

További 10, Kárpát-medencében honos vagy termesztett faj *in vitro* gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata igazolta, hogy a rokon, hasonló összetételű fajok a *C. sadlerianához* hasonló mértékű hatással bírnak. Az esetleges gyógyászati felhasználás szempontjából a termesztésbe vont, illetve a vadon nagy mennyiségben megtalálható fajok perspektívikusnak tűnnek a kizárólag a Kárpát-medencében honos, védett *C. sadlerianával* szemben.