

MAGYARORSZÁGI *CENTAUREA* FAJOK

BIOLÓGIAILAG AKTÍV VEGYÜLETEINEK VIZSGÁLATA

Szakmai beszámoló a PD 71724 OTKA pályázathoz

Dr. Csupor Dezső egyetemi adjunktus

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Farmakognóziái 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 sztigmatsterin és a kampszterin, 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 µM, 5-LOX), indometacin (0,9 µM, COX-1) és NS-398 (2,6 µM, 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 µg/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±5,65	-23,58±11,97	-29,21±10,38
CSE-2	-5,43±11,73	25,11±3,45	-10,99±14,27
CSE-3	80,71±4,56	90,39±2,94	53,23±6,29
CSE-4	76,09±6,65	86,92±5,66	47,49±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. cyanooides*, *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.

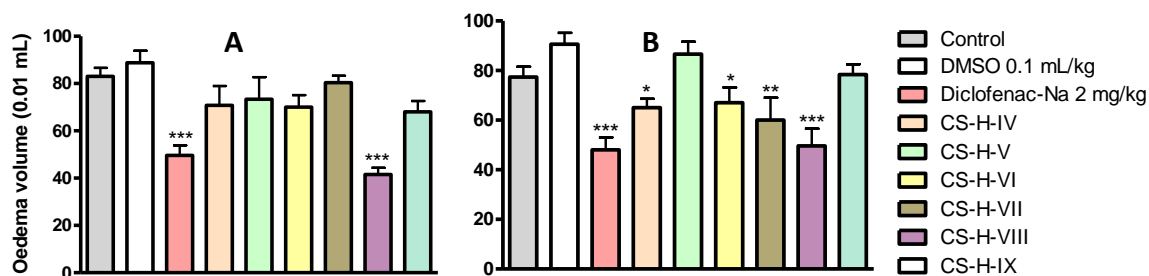
3. táblázat *Centaurea* fajok kivonatfrakcióinak *in vitro* enzimgátló hatása

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. cyanooides</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

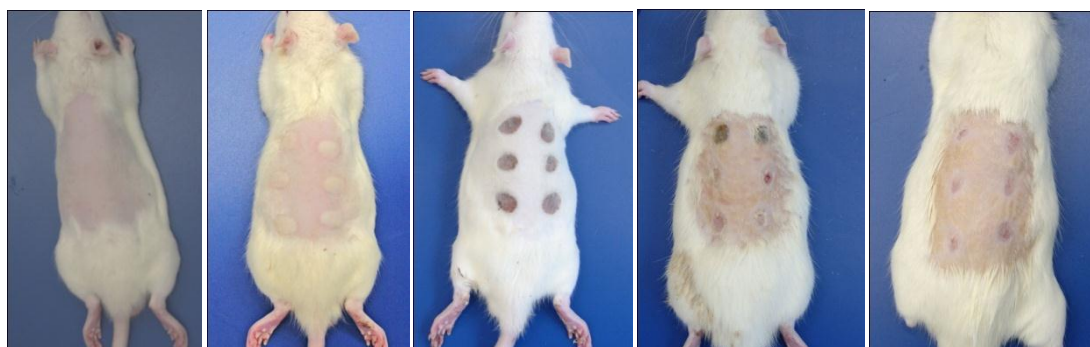
további kromatográfiai tisztításánál. Az izolált vegyületek kis mennyisége nem tette lehetővé hatásuk *in vivo* tanulmányozását.



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

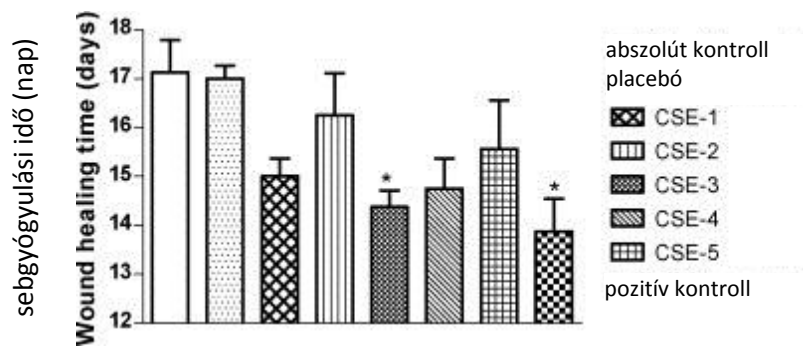
3.2. SEBGYÓGYULÁST ELŐSEGÍTŐ HATÁS *IN VIVO* VIZSGÁLATA

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 kirázás után visszamaradó metanolos kivonatot, illetve a növény forró vizes kivonatát. A növényből izolált vegyületek kis mennyisége nem tette lehetővé hatásuk *in vivo* tanulmányozását. A kivonatok 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 kivonatokot 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 kromatográfiai 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 természetű 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.