

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Farmakognóziai Intézet



Ipari *Cyanotis arachnoidea* kivonatokon és félszintetikus ekdiszteroid származékokon végzett kutatások

Dr. Laczkó Dávid

Ph.D. tézis összefoglaló

Szeged

2025

**Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar**

Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Programvezető: Prof. Dr. Hohmann Judit, DSc
Farmakognóziai Intézet

Témavezetők:
Prof. Dr. Hunyadi Attila, DSc
Dr. Vágvölgyi Máté, PhD

Dr. Laczkó Dávid

**Ipari *Cyanotis arachnoidea* kivonatokon és félszintetikus
ekdiszteroid származékokon végzett kutatások**

Komplexvizsga bizottság:

Elnök:

Prof. Dr. Hohmann Judit, DSc

Tagok:

Prof. Dr. Ilisz István, DSc

Dr. Janicsák Gábor, PhD

Bíráló bizottság:

Elnök:

Prof. Dr. Szatmári István, DSc

Opponensek:

Prof. Dr. Ilisz István, DSc

Dr. Béni Szabolcs, PhD

Bizottsági tagok:

Dr. Jójártné Dr. Laczkovich Orsolya, PhD

Dr. Schelz Zsuzsanna, PhD

BEVEZETÉS

Az ekdiszteroidok egy különleges természetes szteroidcsoport, amelyet 1954-ben fedeztek fel. Ezek a vegyületek a gerinctelen állatokban (ízeltlábúak, korallak, férgek) találhatóak meg, ahol a vedlés és a fejlődés szabályozásban játszanak szerepet, valamint a növényekben, ahol feltehetőleg védelmi szerepet töltenek be. A természetes ekdiszteroidok közül a leggyakoribb a 20-hidroxiiekdizon (20E, **39**), amely gerincteleneknél és gerinceseknél egyaránt fehérjeszintézist indukál, anabolikus, továbbá vércukorszint- és koleszterinszint-csökkentő, immunmoduláló, gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatásokkal is rendelkezik. Sokoldalú farmakológiai tulajdonságaik és anabolikus hatásuk miatt a Doppingellenes Világszervezet felvette a 20E-t a monitorprogramjába 2020-ban. Az ekdiszteroidok a gyógyászati mellett, a mezőgazdasági és kozmetikai vonatkozású alkalmazott kutatások célpontjaivá is váltak nagyszámú, értékes bioaktivitásuknak köszönhetően.

Az ekdiszteroidok számos kísérletileg bizonyítottan pozitív fiziológiai hatással rendelkeznek emlősökre nézve. Alacsony toxicitású vegyületek, az egereknél a toxikus dózis körülbelül 9 g/testtömeg-kg, mely jelentősen vonzerőt jelent a 20E étrend-kiegészítőkben történő alkalmazásához. Az ekdiszteroidok fokozzák a fehérjeszintézist, stimulálják a máj működését, és kemoterápiás gyógyszerekkel kombinálva jelentős daganatellenes hatást fejtenek ki azáltal, hogy csökkentik a gyógyszerrezisztenciát mind az MDR, mind a gyógyszerérzékeny daganatos sejtekben. Ezenkívül, ezek a vegyületek gátolják a glükoneogenezist, így csökkenthetik a hiperglikémiás hatásokat. Az ekdiszteroidokra ismert, hogy jótékony immunmoduláló és adaptogén hatást fejtenek ki, segítve a szerveink alkalmazkodását a külső stresszorokhoz, valamint antioxidáns tulajdonságokkal is rendelkeznek, melynek értelmében gátolják a lipidek oxidációját. A közelmúltban előrelépés történt a hatásmechanizmusuk vizsgálatában, mely a MAS-receptor és a membránhoz kötött palmitoilált ösztrogénreceptor közötti interakciót feltételezi. Friss klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy COVID-19-betegeknél több mint 40%-kal csökkent a légzési elégtelenség előfordulása, illetve klinikailag releváns javulás történt a szarkopéniás betegek fizikai teljesítményében is, 20E hatóanyagként történő alkalmazása esetén.

A kiterjedt vizsgálatok eredményeként jelenleg 590 természetes ekdiszteroid szerepel az online ekdiszteroid adatbázisban, amely rendszeresen frissítésre kerül. Bár az ipar gyakran a *Cyanotis arachnoidea*-ra koncentrálna annak magas ekdiszteroid-tartalma miatt, a fitoekdiszteroidok számos különböző növényfajban is megtalálhatók (többek között *Microsorium membranifolium*, *Achyranthes bidentata* és *Chenopodium*).

Az ekdiszteroidok izolálásával kapcsolatos szakirodalom az 1960-as évekre nyúlik vissza, és ezeknek a vegyületeknek a keverékeiből különböző folyadék-folyadék kromatográfiás módszerekkel, például csepp-ellenáramú kromatográfiával (DCCC), nagysebességű ellenáramú kromatográfiával (HSCCC) és centrifugális megoszlásos kromatográfiával (CPC) lehet izolálni a tiszta komponenseket. Ezek közül a technikák közül a CPC különös figyelmet érdemel terhelhetőségének, méretnövelhetőségének, rugalmasságának és költséghatékonyságának köszönhetően. Jelen tézis a kaloniszteron izolálására és ennek méretnövelésére összpontosít, amely laboratóriumi méretű CPC-t (250 ml rotor térfogat) és félüzemi méretű CPC-t (2100 ml rotor térfogat) foglal magában.

A kaloniszteron egy természetesen előforduló fitoekdiszteroid, amely szokatlan kémiai szerkezettel rendelkezik, többek között egy 14 α -hidroxí-7-én-6-on kromoforral, egy ép szterol oldallánccal és egy ritka *o*-kinol B-gyűrűvel. Számos növényből izolálták, többek között a *Cyanotis arachnoidea*-ból is. Bár a kaloniszteront farmakológiai szempontból kevésbé tanulmányozták ez idáig, ígéretes jelölt lehet különböző klinikai terápiás alkalmazásokhoz.

Az ekdiszteroidok autoxidációja lúgos környezetben széles körben tanulmányozott, mivel ez a folyamat gyakran változatos, ritka szerkezetű ekdiszteroid-származékok képződéséhez vezet, a reakció körülményeitől és a feldolgozási eljárásoktól függően. Továbbá, az ekdiszteroidok hatásának és metabolizmusának megváltoztatásához hatékony megoldás lehet a polaritásuk módosítása is; alacsony polaritású származékok könnyen előállíthatók éterképzéssel, míg karbonil-vegyületek felhasználásával dioxolán-származékok állíthatók elő. Az oxim szerkezeti funkció az iminek csoportjába tartozik, és $RR'C=N-OH$ képlettel írható le. Szintézisének lehetőségei széles körben tanulmányozottak, az aldoxim- és ketoxim-funkciók legkönnyebben hidroxilamin-analógok aldehid és keton funkciós csoportokkal történő reagáltatásával állíthatók elő.

Az oxim szerkezeti funkció előállítása egy ígéretes kémiai átalakítás, mivel az oxim molekularész jelentősen megváltoztathatja a farmakológiai tulajdonságait egy vegyületnek, hozzájárulva a gombaellenes, antioxidáns, gyulladáscsökkentő, antibakteriális vagy akár rákellenes hatásokhoz is. Az ekdiszteroidok regioszelektív oxim-származékjai olyan módon állíthatók elő, hogy a B-gyűrűn lévő keto-csoport érintetlen marad, míg az oldalláncon lévő keto-csoport részt vesz a reakcióban.

CÉLKITŰZÉSEK

Cyanotis arachnoidea kivonatok analitikai értékelése: olyan nagy felbontású LC-MS/MS technika kidolgozása, amely akár 100 komponenst is képes azonosítani, és részletes jellemzést ad mind a természetben előforduló, mind az ipari feldolgozású, ekdiszteroidokat tartalmazó növényi kivonatokról, valamint amellyel összehasonlító elemzés végezhető el a jelentős bioaktivitással összefüggő műtermékek felkutatására.

A kaloniszteron előállításának és izolálásának méretnövelése: olyan módszer kidolgozása, amely alkalmas nagy mennyiségű kaloniszteron előállítására, valamint a termék izolálásához egy méretnövelhető és gazdaságos CPC-tisztítási módszer kidolgozása.

Félszintetikus kaloniszteron-származékok előállítása és vizsgálata: kaloniszteron oldallánc-hasított oxim-éter szerkezetű származékok előállítása és kromatográfiás tisztítási módszerek kidolgozása, valamint kutatási együttműködés keretében a vegyületek vér-agy gát protektív farmakológiai potenciáljának vizsgálata és a lehetséges szerkezet-aktivitás összefüggések feltárása.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Cyanotis arachnoidea kivonatok analitikai értékelése

Minták és analitikai módszer: Az ekdiszteroid standardokat a Szegedi Tudományegyetem Farmakognóziai Intézete biztosította. Két *Cyanotis arachnoidea* kivonatot – CAPR1 (50% 20E, Xi'an Olin Biological Technology, metanollal perkolált) és CAPR2 (10,85% 20E, Kingherbs Limited) – vett részt a vizsgálatban, valamint autentikusnak tekinthető metanolos gyökér- (CARO) és levélkivonatok (CALF), illetve a 20E autoxidált mintája (20EOX). Az RP-HPLC egy Agilent 1260 Infinity II/6420 QQQ-ESI-MS készüléken, Kinetex F5 oszlopon és ammónium-formiát/hangyasav-acetonitril gradienssel, 40 °C-on lett kivitelezve, pozitív ESI-MS (m/z 200–800) DDA és DIA módban, és UV (210, 248, 360 nm) detektálással.

A kaloniszteron előállítása és izolálása

Kaloniszteron szintézis: A 20E autoxidációjának elvégzéséhez 3 g 20E-t oldottunk fel metanol-víz elegyében, 6 órán át nátrium-hidroxiddal kezeltük, egy éjszakán át sósavval savanyítottuk, majd semlegesítettük, 40 °C-on csökkentett nyomáson bepároltuk, és a kapott kaloniszteron-t CPC segítségével tisztítottuk. A frakciókat TLC-vel és HPLC-vel vizsgáltuk, majd a termék végső szárítására került sor.

Oldószerrendszer kiválasztása, CPC módszerek: A folyadék-folyadék kromatográfiához megfelelő oldószerrendszer kiválasztásához meg kell határozni a fő ekdiszteroid komponens és a mintában található fő szennyeződések megoszlási hányadosait (K_D értékeit) a kétfázisú oldószerrendszerekben, amelyeket úgy kapunk meg, hogy a nyers kivonatot előre egyensúlyba hozott kétfázisú oldószerrendszerrel keverjük össze, hagyjuk a fázisokat szétválni, a két különböző fázisból azonos térfogatú mintát veszünk HPLC vizsgálathoz, majd a HPLC mérésekkel meghatározzuk az egyes elválasztandó komponensek csúcsterületeiből a megoszlási hányadosukat. A CPC-elválasztásokat laboratóriumi és félüzemi méretű kromatográfokkal végeztük. A kétfázisú oldószerrendszereket választótölcsérben készítettük elő erőteljes rázással, majd hagytuk a fázisokat szétválni. Ezek a szétválasztott fázisok lettek a későbbiekben a kromatográfiás rendszer álló- és mozgófázisa.

Félszintetikus kaloniszteron-származékok előállítása és vizsgálata

Kaloniszteron oxidatív oldallánc-hasítása és oxim-képzés (99a–99g): Kaloniszteront egy hipervalens jód vegyület (PIDA) segítségével metanolban oxidáltuk, majd az elegyet semlegesítettük és diklórmétán-metanol eluens rendszerrel flash kromatográfiás tisztítást végeztünk, hogy a kívánt terméket (**99a**) megkapjuk. A tisztított vegyületet ezután hidroxil-amin vagy különböző alkoxi-amin-hidroklorid származékokkal etanolban refluxált körülmények között reagáltattuk, és a kapott ekdiszteroid-oxim termékeket (**99b–99g**) extrakcióval majd preparatív RP-HPLC tisztítással izoláltuk. A szerkezeteket HR-MS és NMR mérésekkel határoztuk meg.

Biológiai vizsgálatok: Emberi agyi mikrovaskuláris endotél sejtek (hCMEC/D3) tenyésztését követően és különböző koncentrációjú vizsgálati vegyületekkel lettek kezelve, a sejtek életképessége valós idejű sejt-elektronikus érzékelő elemzéssel (RTCA) és impedancia mérésekkel lett értékelve. A gát funkció integritása TEER-mérésekkel és paracelluláris permeabilitási vizsgálatokkal lett értékelve fluoreszkáló markerek segítségével, míg a teljes ROS-termelés fluorometriás detektálással került mérésre. A statisztikai elemzés átlag $\pm$ SD értékekkel lett végezve, és a szignifikancia $p < 0,05$ -nél lett meghatározva.

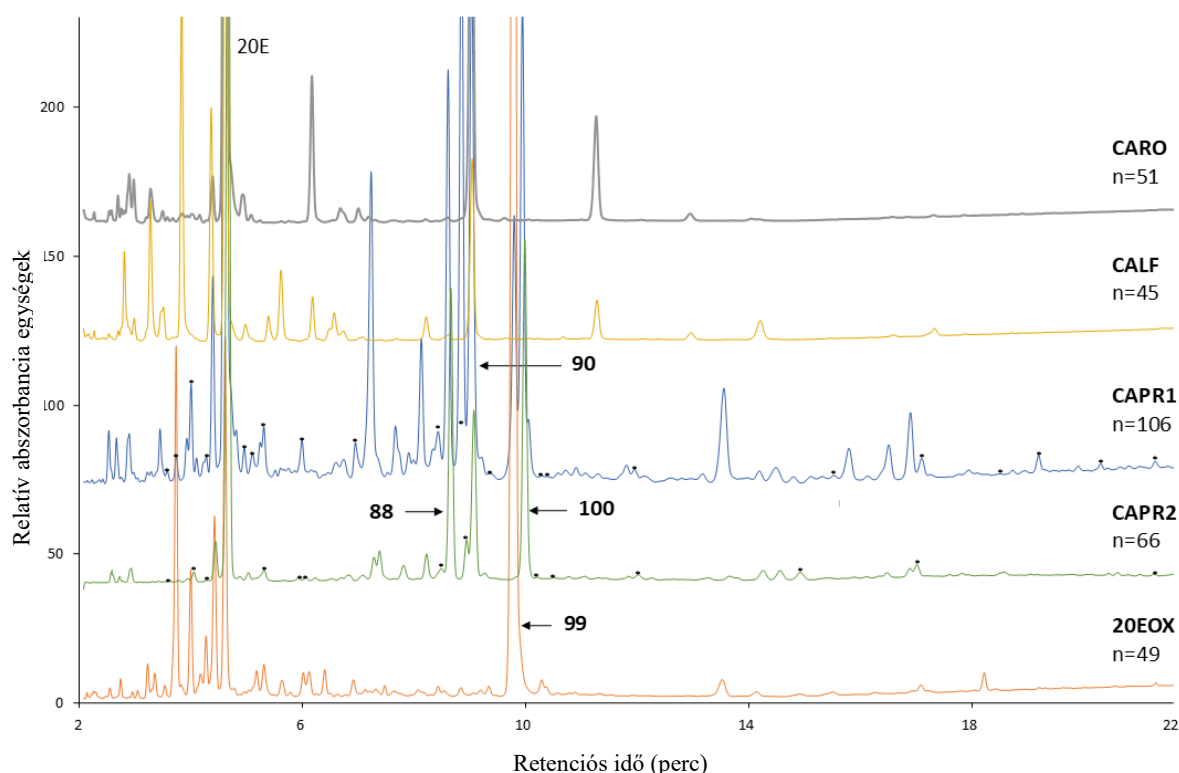
EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

***Cyanotis arachnoidea* kivonatok analitikai értékelése**

Ekdiszteroid tartalmú minták elemzése: Jelen disszertáció keretében öt ekdiszteroid-tartalmú mintát elemeztünk. Két kereskedelmi forgalomban kapható *Cyanotis arachnoidea*

kivonatot (CAPR1 és CAPR2), melyeket két független kínai vállalattól vásároltunk, mivel Kína a *C. arachnoidea* kivonatok fő forgalmazója, mert a növény Ázsiában őshonos. Az autentikus *C. arachnoidea* növény Tajvanról származik, melynek a gyökereit és leveleit elkülönítették, és metanollal kivonták, ezeket CARO, illetve CALF mintának hívjuk a későbbiekben. Az előzetes kísérletek azt mutatták, hogy a CAPR1 lényegesen több komponenst tartalmazott, mint az autentikus kivonatok, ami arra utalhat, hogy az ipari feldolgozás során műtermékek keletkezhetettek. A 20E bázis által katalizált autoxidációs termékkeverék (20EOX) szolgált az ötödik analitként, ennek a hipotézisnek az értékeléséhez.

Fordított fázisú HPLC-MS segítségével vettük fel az ekdiszteroid ujjlenyomatokat Kinetex F5 oszlop alkalmazásával. Ez az oszlop felületileg porózus pentafluorofenil-propil állófázissal rendelkezik, amely hasonló szelektivitású alternatívát kínál a hagyományos C18 oszlopokhoz képest. Az elválasztás paramétereinek kiválasztása során egyensúlyba hoztuk a túl hosszú futási időt, amely szélesebb csúcsokat eredményezne, és a túl rövid futási időt, amely viszont koelúciót okozhatna a komponensek között (**1. ábra**)



1. ábra: CARO, CALF, CAPR1, CAPR2 és 20EOX minták HPLC-s kromatogramja. Az UV-detektálást 248 ± 4 nm-en végeztük. A kereskedelmi kivonatokban megtalálható, viszont a természetes kivonatokban nem előforduló csúcsokat csillaggal (*) jelöltük a CAPR1 és CAPR2 kromatogramján.

Az azonosított ekdiszteroidok LC-MS adatai: Az analitikai értékelést nagyban segítették a korábbi munkák során izolált vegyületek. Számos ekdiszteroidot azonosítottunk a korábbi kutatásokból származó hiteles referenciaanyagok segítségével (**2. táblázat** és **3. ábra**). A kivonatokban ezt a 25 anyagot használtuk fel az azonosításra.

Az ekdiszteroidokat tartalmazó minták összehasonlítása: Az ujjlenyomatok alapján páronként összehasonlítottuk a kivonatokat, és pontosan megszámoltuk, hány közös csúcsuk volt a detektálási határ szintjén. Ezután százalékban fejeztük ki, hogy az összehasonlított minták komponenseinek hány százaléka található meg a másik mintában, miközben a 100% azt jelentette, hogy egy kivonat összes csúcsa megtalálható a másik kivonatban. Az elemzés eredményeit az **1. táblázat** foglalja össze.

1. táblázat: Az kivonatok ujjlenyomatainak összehasonlítása. Metszéspon: a közös vegyületek száma.

1.	2.	Metszéspon	Hasonlóság (%)	
			1 a 2-höz	2 az 1-hez
CAPR1	CAPR2	52	49	79
CAPR1	CARO	41	39	80
CAPR1	CALF	32	30	71
CAPR1	20EOX	33	31	67
CAPR2	CARO	30	45	58
CAPR2	CALF	21	32	46
CAPR2	20EOX	15	23	31
CARO	CALF	37	73	82
CARO	20EOX	2	4	4
CALF	20EOX	1	2	2

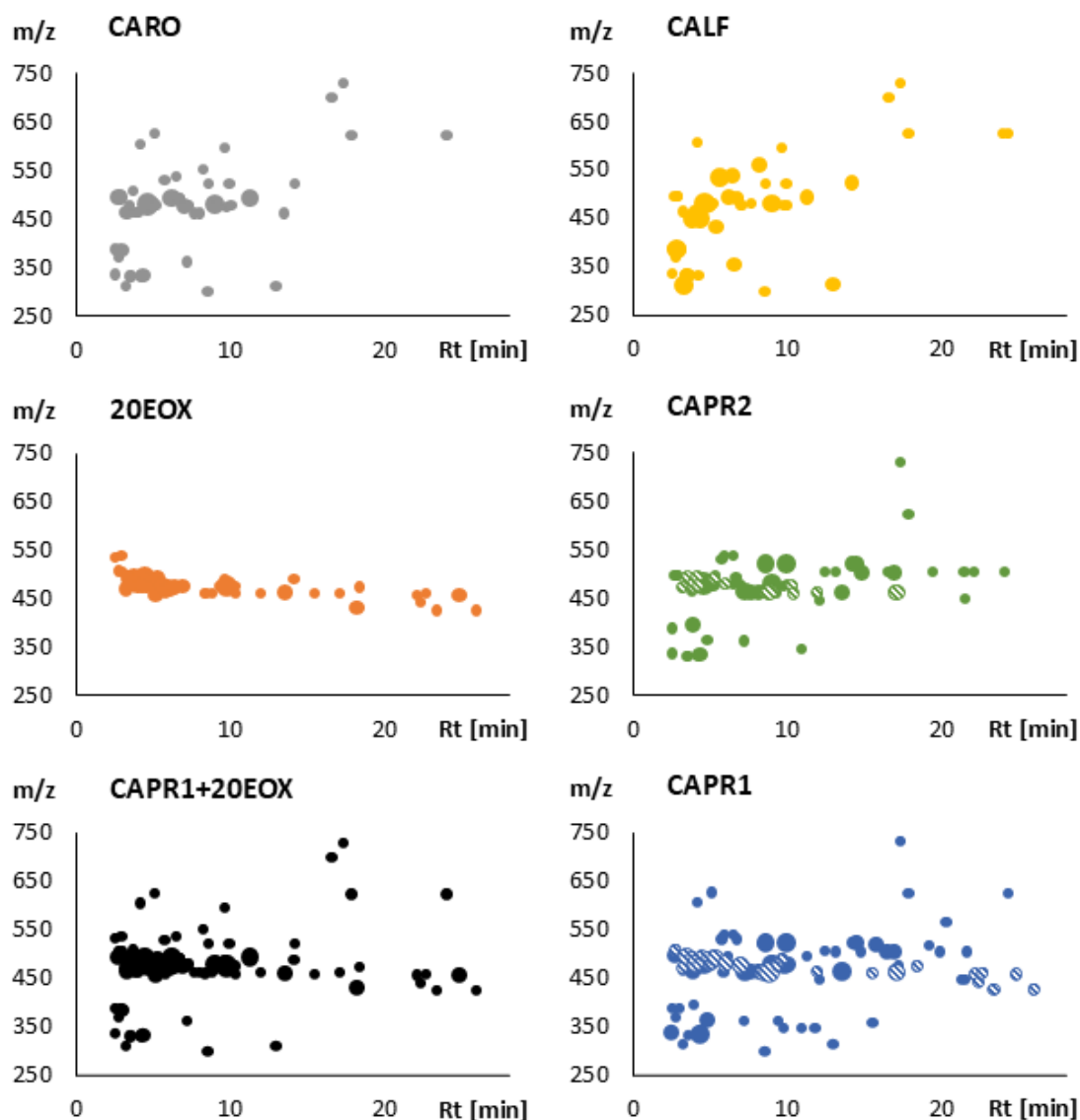
Célunk az volt, hogy összehasonlítsuk a vadon gyűjtött *C. arachnoidea* gyökér és levél (CARO és CALF) autentikus kivonatait az ipari feldolgozású kivonatokkal. Klasszikus HPLC-s elemzéssel mindkét autentikus kivonatban körülbelül 50–60 komponens volt kimutatható. A 20E volt a fő komponens mindkét kivonatban, amelyek jelentős mennyiségű ajugaszteron C-t tartalmaztak még. Minőségi összetételük nagyon hasonló, azonban a gyökérkivonat ekdiszteroid-tartalma jelentősen magasabb, mint a levélkivonaté. A CAPR1 és a 20EOX összehasonlítása után a 20E lúgos autoxidációs termékeinek közel 70%-a kimutatható volt a CAPR1-ben, ami arra utal, hogy az ipari feldolgozás során oxidatív műtermékek

keletkezhetnek. A bázikus autoxidáció minden olyan ekdiszteroid esetében előfordulhat, amelynek B-gyűrűjében 7-én-6-on molekularész található. Mivel a 20EOX komponensei egyetlen vegyületből (20E) származnak, ezért kevésbé komplex, mint amit a sokkomponensű *C. arachnoidea* kivonat autoxidációja alapján várhatnánk.

2. táblázat: A 25 referencia anyag segítségével azonosított ekdiszteroid HPLC-MS jellemzői és azok félkvantitatív jelenléte a mintákban. A feltételezett eredet színek: zöld, természetes vegyület; sárga, oxidált műtermék; lila, természetes vegyület, amelynek mennyisége az oxidáció hatására valószínűleg megváltozott. A színnel nem jelölt vegyületek természetes vagy műtermék jellegét a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehetett meghatározni. A bővített táblázat a 2-es számú publikáció kiegészítő adatai között található (**S2 táblázat**).

No.	Név	Retenciósi idő (perc)	[M+H] ⁺	Jelenlét				
				CAPR1	CAPR2	CARO	CALF	20EOX
17	Oxikaloniszteron C	3.28	493.3	+	-	-	-	++
39	20-hidroxiokdizon	4.53	481.2	++++	++++	++++	++++	+++
70	Izovitexiron	6.93	479.1	+	+	++	+	-
71	Posztszteron	7.10	363.1	+	+	+	-	-
72	14-deoxi-20-hidroxiokdizon	7.15	465.3	+++	+++	-	-	-
73	14-deoxi-25-hidroxiakrihainanszteron	7.20	463.3	+	+	-	-	-
78	5 α -14-deoxi-20-hidroxiokdizon	7.82	465.2	+	-	-	-	-
79	5 α -stachyszteron B	7.91	463.3	+	-	+	-	-
80	14-epi-14-deoxi-20-hidroxiokdizon	8.05	463.2	++	++	-	-	-
88	20-hidroxiokdizon 3-acetát	8.53	523.3	+++	+++	+	+	-
90	Ajugaszteron C	8.95	481.3	+++	+++	+++	+++	-
91	14-epi-14,15-dihidrokaloniszteron	9.00	461.2	+	-	-	-	-
97	Oxikaloniszteron A	9.61	491.2	+	-	-	-	+
98	14-epi-14-deoxi-20(S)-dihidroposztszteron	9.66	349.2	+	-	-	-	-
99	Kaloniszteron	9.72	477.2	+++	+	+	+	++++
100	20-hidroxiokdizon 2-acetát	9.86	523.3	+++	+++	+	+	-
106	14 β (H)17 β (H)-14-deoxiposztszteron	11.73	347.2	+		-	-	-
111	5 α -stachyszteron B 2-acetát	13.09	505.3	+	+	-	-	-
112	Dakrihainanszteron	13.46	463.3	+++	++	+	-	++
124	Oxikaloniszteron B	17.17	475.2	+	-	-	-	-
131	Dakrihainanszteron 3-acetát	19.82	505.2	+	-	-	-	-
133	14-deoxidakrihainanszteron	21.21	447.3	+	-	-	-	-
135	5 α -2-deoxiponaszteron A	21.46	449.2	+	+	-	-	-
136	Dakrihainanszteron-2-acetát	21.61	505.3	+	-	-	-	-
140	22-oxodakrihainanszteron	22.60	461.2	+	-	-	-	+

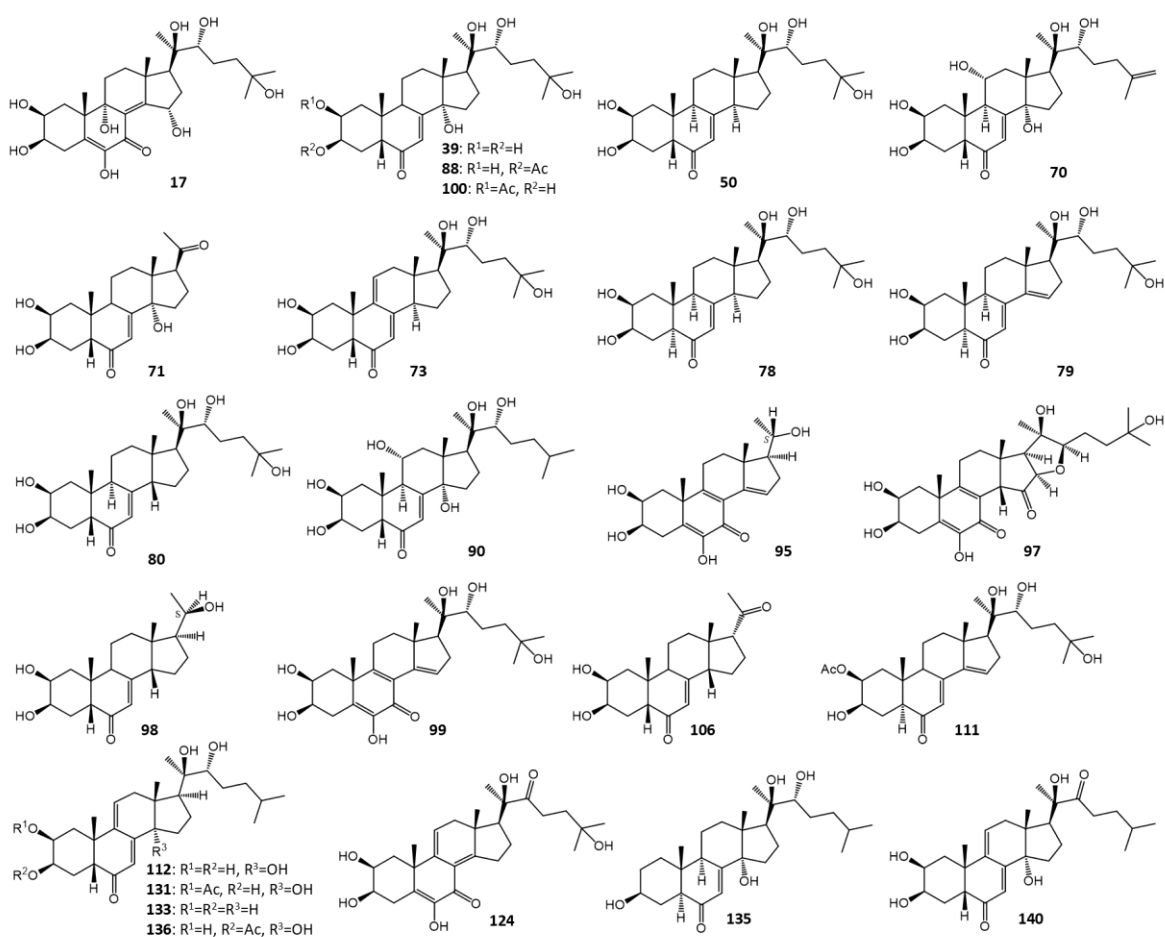
A CAPR2 kivonat összetétele jobban hasonlított az autentikus CARO mintához, mint a CAPR1, azonban a CAPR2 is tartalmazott olyan vegyületeket, amelyek műtermékképződésre utalnak. Ez a kivonat különösen gazdag volt acetát származékokban, ami ecetsav felhasználására utalhat a feldolgozás során (**2. ábra**).



2. ábra: Az elemzett minták LC-MS ujjlenyomatainak áttekintése: CARO, CALF, 20EOX, CAPR1 és CAPR2; CARO+20EOX: CARO és 20EOX matematikai összege. A pontok mérete az egyes csúcsok relatív csúcsterületi értékeit reprezentálja. A csíkos jelzés a feltételezett műtermékeket jelölik.

A kisebb mennyiségben előforduló fitoekdiszteroidok farmakológiájáról meglehetősen keveset tudunk az emlősökben, annak ellenére, hogy a 20E-vel kapcsolatos egészségügyi

előnyök széles körben ismertek, és néhányat közülük klinikai vizsgálatok is egyértelműen megerősítettek (pl. a COVID-19 vagy a szarkopénia ellen). Korábbi kutatásainkban kimutattuk, hogy a kevésbé poláros ekdiszteroidok, beleértve az acetonid származékokat, a 20E-vel ellentétes hatást gyakorolnak a ráksejtek gyógyszerrezisztenciájára. Az anyamolekulához képest a 20E autoxidált származékjai, mint például a **99-es** vegyület, jelentősen nagyobb hatást gyakorolnak a protein kináz B (Akt) aktiválására. A 20E más oxidált analógjai szintén erős hatást gyakoroltak a sejtek túlélését és elhalását szabályozó két fontos rendszerre, az AMPK-ra és az Akt-ra. Ezek a példák azt mutatják, hogy a növényi kivonat ekdiszteroid-összetételének megváltozása jelentősen megváltoztathatja az általános bioaktivitási profilt is.



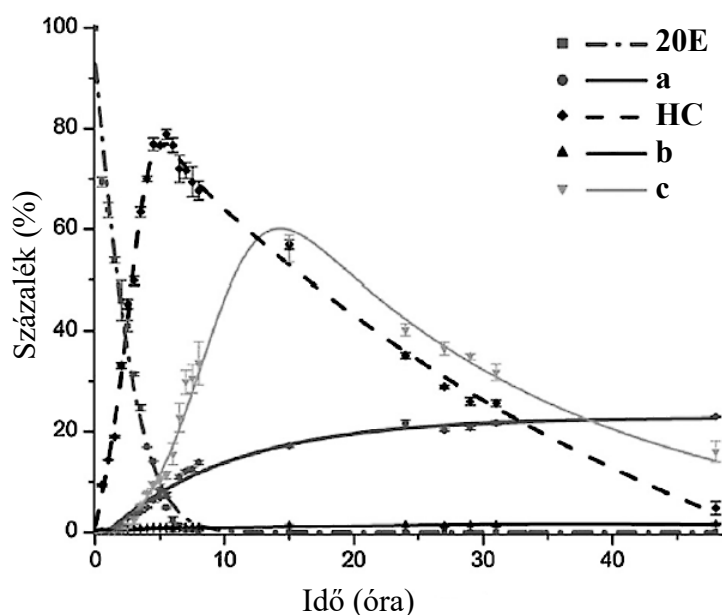
3. ábra: A referenciaként használt ekdiszteroid vegyületek kémiai szerkezete.

A kaloniszteron előállítása és izolálása

A kaloniszteron szintetikus előállítása: Kaloniszteron nagyléptékű félszintetikus előállításának tervezése a kutatócsoport korábbi kutatásain alapult, amelyek során kapilláris

elektroforézissel lett nyomon követve a 20E autoxidációs összetételének változása lúgos környezetben. A kulcsfontosságú köztermék, a 14,15-dihidro-14 α -hidroxi-kaloniszteron (HC) báziskatalizált 14-OH eliminációval izokaloniszteront, vagy savkatalizált reakcióval kaloniszteront eredményez. A vizsgálat során a prekursor a maximális mennyiségét (~80%) 5,5-6 óra után érte el, lúgos környezetben történő kevertetés közben (**4. ábra**).

Az eredmények azt mutatják, hogy az autoxidáció után erősen savas környezet (pH=1) szükséges a megfelelő vízeliminációs folyamat végbemeneteléséhez. Ezt a pH-értéket körülbelül 16 órán át kell fenntartani, a hosszabb expozíció azonban növeli a bomlástermékek mennyiségét. A semlegesítés során ügyelni kell, hogy a pH ne haladja meg a 7-es értéket, mivel a kaloniszteron enyhén lúgos körülmények között hajlamos dezmotróp átalakulásra, amely rontja a kitermelést, így a későbbi izolációs lépések 6-os pH érték körül optimálisak. A módszert követve 77% kaloniszteron-tartalmat sikerült elérni UV (248 $\pm$ 4 nm) detektálással HPLC segítségével meghatározva.



4. ábra: A 20E, a, HC, b és c összetételének változása a 20E autoxidáció reakció során.

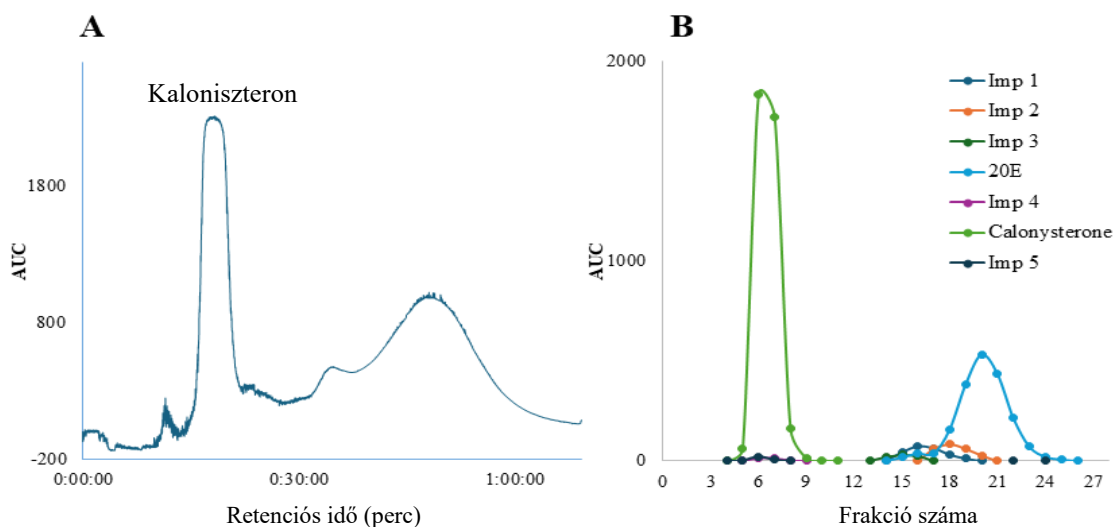
Oldószerrendszer kiválasztása: A sikeres CPC-elválasztás alapelve az ideális komponens-összetételű oldószerrendszer azonosítása. A kétfázisú oldószerrendszerek általános követelményei: optimális megoszlás a célkomponensek számára ($K_D=0,5-2,0$); magas szelektivitás ($\alpha>1,5$) a vegyületek között; rövid szétválási idő (<30 másodperc), az oldószer alacsony költsége, alacsony toxicitása és a minta magas oldhatósága. Az oldószerrendszer kiválasztásához megfelelő alapot biztosítottak az irodalmi kutatás és a korábbi ekdiszteroidokkal kapcsolatos mérések eredményei. A K_D -mérések azt mutatták, hogy a

keton/észter – alkohol – víz összetételű rendszerek esetében a legjobb az oldhatóság és optimális a megoszlás az ekdiszteroid komponensek számára.

A módszer kidolgozása során figyelembe vettünk ipari tényezőket, és környezetbarátabb oldószereket és fenntartható alternatívákat használtunk (pl. limonén hexán helyett), továbbá figyelembe vettük az FDA ICH Q3C iránymutatásit is. Az elválasztási időt 30 perc alatt tartottuk, beleértve kromatográfiás rendszer egyensúlyba hozásának szakaszát is. Az aszcendens (felszálló) módot részesítettük előnyben, mivel ez megkönnyíti és olcsóbbá teszi a frakciók későbbi feldolgozását. Arra törekedtünk, hogy a kaloniszteron K_D -értékét 1 körülire állítsuk be, mivel ezen a ponton a legjobb az elválasztás. Ezeket figyelembe véve a következő oldószer-rendszereket választottuk ki további vizsgálatra: **labCPC No1.** MIBK – acetone – H₂O (3:4:3, v/v); **labCPC No2.** EtOAc – MeOH – H₂O (4:2:4, v/v); **labCPC No3.** EtOAc – MeOH – H₂O (4:1,5:4, v/v); **labCPC No4.** MEK – EtOAc – H₂O (5:1:4, v/v); **labCPC No5.** MIBK – MeOH – H₂O (1:1:1, v/v).

A kaloniszteron centrifugális megoszlásos kromatográfiás izolálása: A szűrés során ígéretesnek bizonyult oldószerrendszereket laboratóriumi méretű CPC-n teszteltük, a következő paraméterek alkalmazásával: 2000 rpm forgási sebesség, 15 ml/perc áramlási sebesség és 20 ml frakciógyűjtés a felső szerves fázisból. Az aszcendens mód mellett, hogy a megkönnyíti a frakciókban maradt szerves oldószerek eltávolítását, a reakció során a mintába került nagy mennyiségű só hatékony eltávolításának is kedvez, mivel ilyenkor a víztartalmú fázis az állófázis, így a sótartalom csak egy elhanyagolható hányada eluálódik. Ezáltal a kromatográfiás tisztítás egyben a visszamaradt só eltávolításának lépését is magában foglalja.

A laboratóriumi mérésekhez 1 gramm mintát oldottunk fel 10 ml alsó fázisban. A magas sótartalom miatt az alsó, vizes fázisban való oldás volt az egyetlen megvalósítható lehetőség. A mérések alapján elmondható, hogy az EtOAc-t és MeOH-t tartalmazó oldószerrendszerek (**labCPC No2.** és **No3.**) szebb csúcsalakokat eredményeztek, mint a MEK- és MIBK-rendszerek (**labCPC No1., No4.** és **No5.**). Mindkét EtOAc/MeOH rendszer hasonló elválasztási és tisztasági eredményeket mutatott. A magasabb MeOH-tartalmú rendszert választottuk a méretnöveléshez, mivel rövidebb volt a futási idő, illetve a metanol tartalom magasabb oldhatóságot biztosított (**5A és 5B ábra**).



5. ábra A: A labCPC No2. kromatogramja. Az UV-detektálást 248 ± 4 nm hullámhosszon végeztük.

B: A labCPC No2. fraktogramja, amely a frakciók analitikai mérései alapján készült.

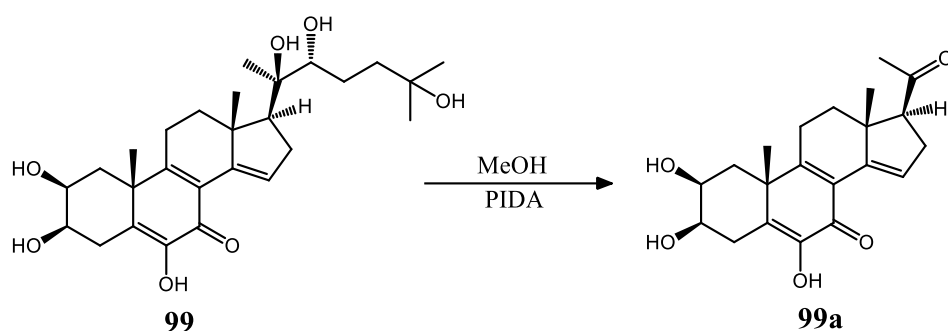
Az EtOAc - MeOH - H₂O (4:2:4, v/v) oldószerszisztem lett kiválasztva félüzemi méretre történő méretnövelésre. Ez 8 g-os mintamennyiséget jelentett futásonként egy 2100 ml-es CPC rotoron. Az elválasztás hossza 20 perc, amelynek csúcsai a nagyobb terhelés miatt azonban kiszélesedtek. Az elért 95%-os tisztaság, 85%-os kalkulált hozam és 63,1%-os izolált hozam azonban a méretnövelési lehetőségeket igazolja.

Kaloniszteron félszintetikus származékjainak előállítása és vizsgálata

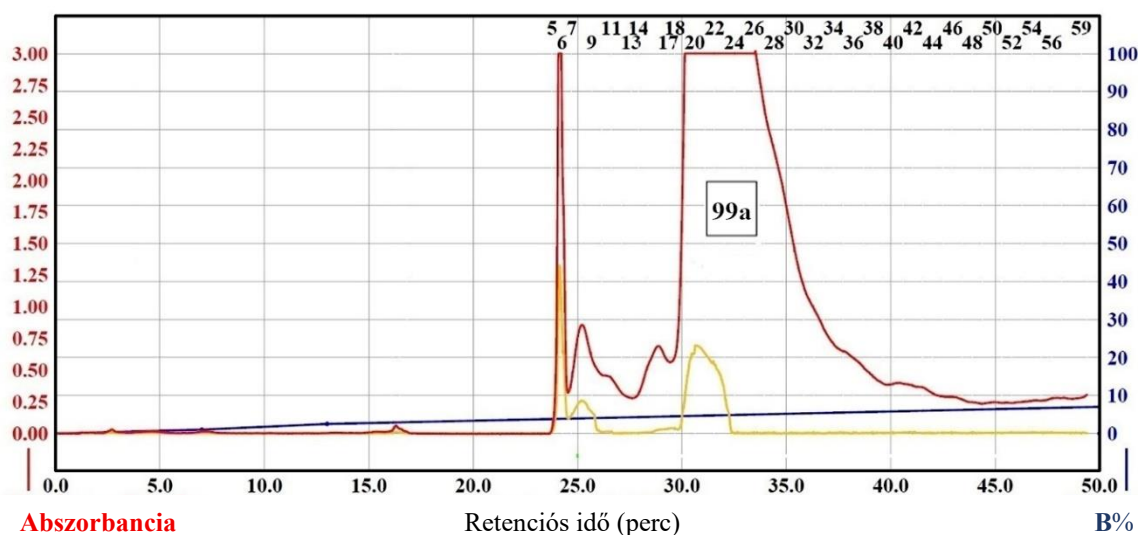
Az oldallánc oxidatív hasítása: A kaloniszteron oldalláncának regioszelektív hasítását a C-17 pozícióban a 20,22-diol között PIDA-val végeztük (**6. ábra**), amely kevesebb mellékterméket képződéssel jár, min a PIFA. A reakció TLC-vel történő nyomon követése alapján 1 óra alatt befejezettnek tekinthető. A reakció befejezését követően az oldatot 10%-os NaHCO₃ vizes oldatával semlegesítettük. Az oldószert rotációs vákuum-bepárlóval eltávolítottuk, majd a kapott terméket normál fázisú flash-kromatográfiával tisztítottuk (**7. ábra**), amely a magasabb kromatográfiás terhelhetőség és az oldószer könnyebb eltávolítása miatt praktikusabbnak bizonyult, mint a fordított fázisú megközelítés. 4,86 g kiindulási anyagból 1,79 g terméket izoláltunk, amely 45,5% kitermelést jelent a **99a** tekintetében.

Kísérlet a C-7-oxim funkció előállítására a kaloniszteron B-gyűrűjén: Korábbi vizsgálatok bebizonyították, hogy a posztszteron C-6-enon funkciója viszonylag kevésbé reaktív az oxim-funkció kialakítása tekintetében, mint a C-17-oxo csoportja. A kaloniszteronnal végzett előzetes kísérleteink során pedig változatos körülmények között, több oldószer használatával sem sikerült az oxim-funkciót kialakítani a C-7 pozícióban, ezért

feltételeztük, hogy az oxidatív oldallánc-hasítás után keletkező C-17-acetil-oxo csoport regioszelektív oxim-képződésre ad lehetőséget.

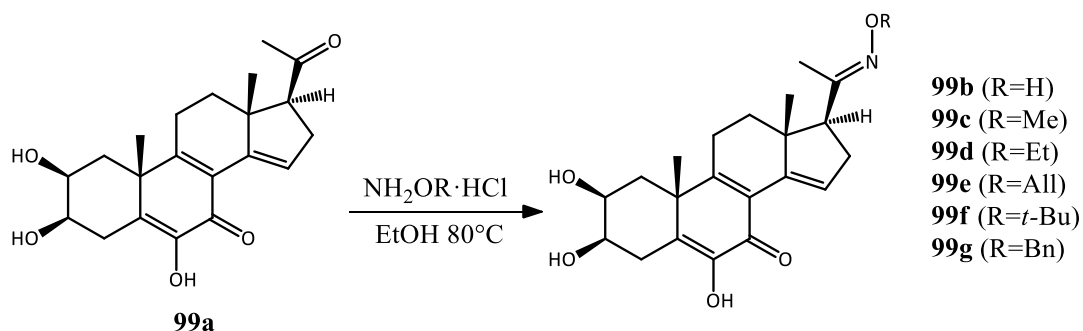


6. ábra: A kaloniszteron oldallánc eltávolítási reakciója.



7. ábra: A **99a** vegyület normál fázisú Flash-kromatográfiás kromatogramja. Az UV-detektálást 248 ± 4 nm hullámhosszon végeztük (piros).

Oxim-származékok regioszelektív szintézise: A C-7 pozícióban lévő karbonil-csoport inert maradt az oxim-képző reakciókban, továbbá a kaloniszteron esetében az ekdiszteroidokra jellemző 14α -hidroxil-csoport hiánya előnyös volt a reakció tervezése során, mivel ez a hidroxil-csoport érzékeny mind a savas, mind a bázikus környezetre, ami a savas pH-n végbemenő reakció esetén problémát jelenthetett volna (**8. ábra**). A reakciókövetés alapján az összes reakció 40 percen belül befejezettnek tekinthető. A piridin helyett az etanolt választottuk preferált oldószerként, mivel alacsonyabb forráspontja megkönnyítette a reakció végén a feldolgozást. Ezt rotációs vákuum-bepárlás és folyadék-folyadék extrakció követte vízzel és etil-acetáttal, amely a termékek elválasztását szolgálta a keverékben található sóktól.



8. ábra. A **99b–99g** vegyületek szintézise.

HPLC vizsgálatokat követően szemi-preparatív fordított fázisú HPLC-vel izoláltuk a termékeket, így elérve >97% tisztaságot 254±4 nm detektálási hullámhosszon. Az enyhén torzult csúcsalakok oldhatósági problémáknak tudhatóak be, amit a >99,9% spektrális tisztaság megerősített. Az összes, 120 mg **99a** kiindulási anyagból előállított vegyület termelési adatait a **3. táblázat** tartalmazza.

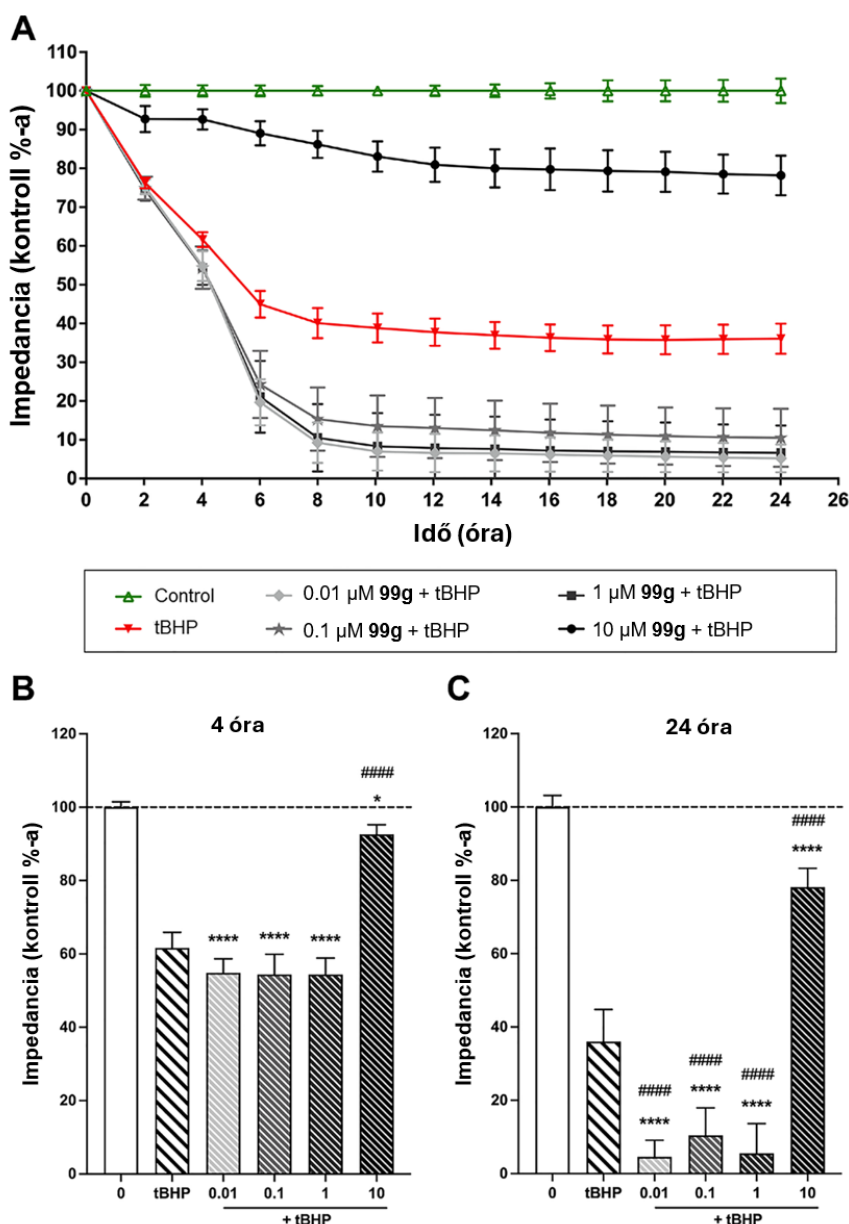
3. táblázat: A **99b–99g** termelési adatai.

C20-NOR	Izolált termék	Tisztaság	Izolált termelés
99b (R=H)	49.4 mg	98.1%	39.5%
99c (R=Me)	33.1 mg	99.1%	25.5%
99d (R=Et)	50.6 mg	98.0%	37.7%
99e (R=All)	52.1 mg	98.8%	37.7%
99f (R= <i>t</i> Bu)	27.8 mg	97.4%	19.4%
99g (R=Bn)	54.9 mg	97.1%	35.3%

Szerkezetmeghatározás: A **99b–99g** vegyületek szerkezetmeghatározása alatt HRMS és NMR ^1H és ^{13}C méréseket értünk. A regioselektivitást és az újonnan kialakult funkciókat egy- és kétdimenziós NMR-módszerekkel határoztuk meg, beleértve az ^1H NMR, ^{13}C DeptQ, edHMQC, HMBC és szelektív ROESY spektrumokat, valamint HRMS-t. Minden vegyület NMR-spektrumában csak egy jel volt látható a megfelelő helyen, ami azt jelzi, hogy a reakciók regioselektív oxim képződéshez vezettek. A $\delta\text{C-20}$ $\Delta\delta$ 55 ppm diamágneses változása alátámasztotta a $\text{C=O} \rightarrow \text{C=NOR}$ átalakulást. A szelektív ROESY mérésekkel megkülönböztethetőek a (*Z/E*) izomerek a CH3-21 jeleken, és a szterikus válaszok egyértelműen alátámasztották az oxim-csoport *E*-konfigurációját.

A termékek biológiai értékelése: A biológiai vizsgálatok során a vegyületek hatását a hCMEC/D3 sejtek életképességére impedancia mérések révén végezték a 0,01–10 μM koncentrációtartományban, ahol a **99g** vegyület mutatta a legmagasabb és legjelentősebb aktivitást. A vegyület minden tesztelt koncentrációban pozitív hatást gyakorolt a sejtek integritására (**9. ábra**). A 350 μM *terc*-butil-hidroperoxid (tBHP) által kiváltott oxidatív

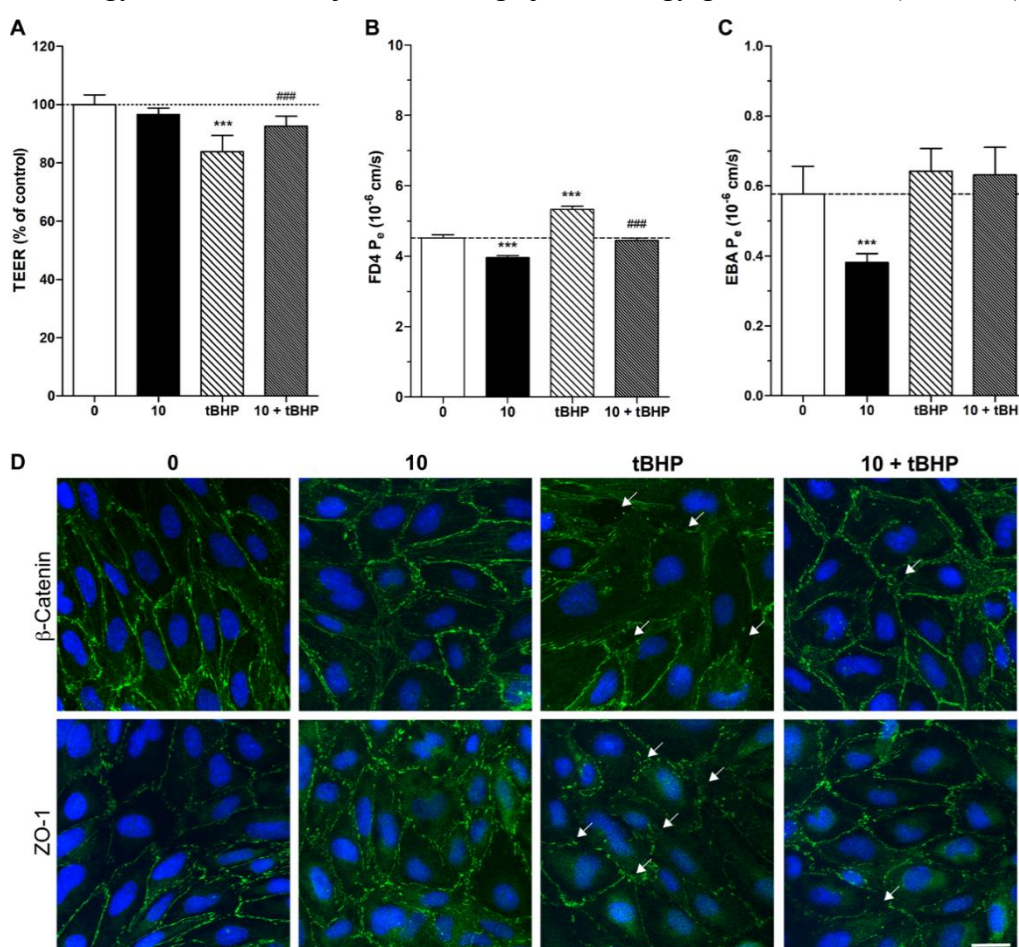
károsodás elleni ROS-ellenes szerként értékelve a 10 μM koncentrációjú **99g** vegyület hatékonyan védte a sejteket a káros hatásoktól, míg kisebb koncentrációkban (10 nM, 100 nM és 1 μM) meglepő módon növelte a tBHP által kiváltott toxicitást. A mérésekben szereplő vegyületek félszintetikus oxim-éter szerkezetű ecdiszteroidok, amelyek a természetben vagy a természetes anyagok metabolitjaiban nem fordulnak elő, ezért ezek az eredmények nem utalnak közvetlenül a fitoeckdiszteroidok fogyasztásával kapcsolatos kockázatra.



9. ábra A **99g** vegyület 0,01, 0,1, 1 és 10 μM koncentrációjú kezelésének hatása emberi agyi mikrovaskuláris endoteliális sejtekre (hCMEC/D3) impedancia-alapú vizsgálattal. **A:** A **99g** hatása a sejtek életképességére tBHP (350 μM) együttes kezelés után. **B:** A **99g** hatása a sejtek életképességére 4 órával tBHP (350 μM) együttes kezelés után. **C:** A **99g** hatása a sejtek életképességére 24 órás tBHP (350 μM) együttes kezelés után. Az adatok átlag $\pm$ szórás (SD) formában vannak feltüntetve, és

legalább két független kísérletből (n = 2–3) származnak, 3–9 technikai ismétléssel. Az adatok elemzését egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) készültek, amelyet Dunnett többszörös összehasonlító teszt követett. Az eredmények statisztikailag szignifikánsak voltak *p < 0,05, ***p < 0,0001 értékekkel a kontrollcsoporthoz képest, és #####p < 0,0001 értékekkel a tBHP-csoporthoz képest.

Barrier integritás vizsgálatok: A 10 μ M koncentrációjú **99g** vegyület védő hatást mutatott a tBHP által kiváltott ROS károsodás ellen azáltal, hogy fenntartotta a transzendenteliális elektromos ellenállást (TEER), csökkentette a paracelluláris permeabilitást mind a 4 kDa FITC-dextrán (FD4), mind az Evans blue-val jelölt albumin (EBA) esetében, és megőrizte az agyi endoteliális sejtek morfológiáját a vér-agy gát modellben (**10. ábra**).



10. ábra A **99g** vegyület (10 μ M) hatása az emberi agy mikrovaskuláris endoteliális sejteinek (hCMEC/D3) barrier integritására **A:** Transzendenteliális elektromos ellenállás (TEER) mérése. **B:** Áteresztőképesség mérése, FITC-dextrán 4 kDa (FD4). **C:** Áteresztőképesség mérése, Evans blue-val jelölt albumin (EBA, 67 kDa). **D:** Immuncitokémia β -katenin és zonula occludens-1 (ZO-1) kapcsolódási molekulákra.

ÖSSZEFOGLALÁS

Ezen tézis keretén belül az ipari *Cyanotis arachnoidea* kivonatok széleskörű analitikai vizsgálatával, számos oxidált ekdiszteroid szerkezetű műtermék jelenlétét tártuk fel. Ez alapvetően mind veszélyt, mind pedig lehetőséget is jelenthet ilyen típusú ekdiszteroid kivonatok jövőbeni felhasználása során. Egyrészt az intenzíven növekvő étrend-kiegészítő piac és a növényi kivonatok egyre szélesebb körű forgalmazása egyértelműen aggodalomra ad okot, mivel korlátozott a tudásunk ezeknek az új, kémiai sokféle, műtermékeknek a toxikológiai jellemzőiről. Másrészt ezek közül az újonnan feltárt műtermékek közül néhány maga is potenciális bioaktív ágensként szolgálhat, és gyógyszerkutatási értékkel bírhat, mely megfelelő ipari körülmények között kiaknázzható lehet. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy további tanulmányokra van szükség a 20E-nél kisebb mennyiségben előforduló ekdiszteroidok biztonságosságáról és farmakológiájáról, amelyeket kivonatok formájában világszerte fogyasztanak az emberek, többek között, de nem kizárólagosan a testépítők és a sportolók.

Az ekdiszteroidokról szóló általánosan bővülő tudományos ismereteink alapján egyértelmű azonban, hogy a szerkezeti sokféleségükkel összetett biológiai profil is társul. Ezen ismeretek bővítéséhez releváns *in vivo* és esetlegesen klinikai vizsgálatokra lenne szükség, megfelelő mennyiségű tiszta vegyületre lenne igény, így releváns törekvés az egyszerű, gazdaságos és méretnövelhető félszintetikus és/vagy izolációs stratégiák kidolgozása a származékok előállítására. Korábban már több ígéretes bioaktivitás is feltárássra került a kaloniszteron esetében. Ezen értekezés keretében sikeresen kifejlesztettünk egy félszintetikus előállítási módszert, amely 20E-t használ kiindulási anyagként, ami egy olcsó kereskedelmi forgalomból is nagy mennyiségben beszerezhető ekdiszteroid. A kaloniszteron 20E-ből történő előállítása után sikeresen kifejlesztettünk egy méretnövelhető centrifugális megoszlásos kromatográfiás tisztítási módszert, amely teljes mértékben alkalmazkodik a nyers reakcióelegy szerves és szervetlen szennyeződéprofiljához. A módszer könnyen átültethető lehet ipari méretekre is, reményeink szerint megkönnyítve ezzel a vegyülettel kapcsolatos későbbi vizsgálatok mennyiségi igényeinek kielégítését.

A 20E neuroprotektív hatásának megerősítését követően, e disszertáció célja többek között az is volt, hogy új, potenciálisan vér-agy-gát védő hatással rendelkező ekdiszteroid-származékokat állítsunk elő. Előzetes eredményeink alapján a kaloniszteron oldalláncának regioszelektív módosítását tűztük ki célul, hogy szerkezetileg eltérő oxim- és oxim-éter-származékokat állítsunk elő. A reakciókörülmények optimalizálása után az oldallánc oxidatív hasítása a C-17 pozícióban történt, amelyet regioszelektív oxim-éter képződés követett. A

disszertáció keretében sikeresen előállítottunk 7 új szterol oldalláncot nem tartalmazó ekdiszteroid-származékot, és teszteltük azok vér-agy-gát védő potenciálját. Míg magas koncentrációban a **99g** neurovaszkuláris védőanyagként hatott, alacsony koncentrációban fokozta a stressz okozta sejtkárosodást. Ez arra utal, hogy bizonyos ekdiszteroid-származékok váratlan és nem kívánt káros (mellék)hatásokkal járhatnak. Eredményeink rávilágítanak a felszintetikus ekdiszteroid-származékok további részletes vizsgálatának fontosságára, példaként emelve ki ezt a váratlan bioaktivitási profilváltozást.

Publikációs lista

- I. *17-Oxime ethers of oxidized ecdysteroid derivatives modulate oxidative stress in human brain endothelial cells and dose-dependently might protect or damage the blood-brain barrier.* Máté Vágvölgyi, Dávid Laczkó, Ana Raquel Santa-Maria, Judit P Vigh, Fruzsina R Walter, Róbert Berkecz, Mária A Deli, Gábor Tóth, Attila Hunyadi **PLoS One** 2024; 19 (2): e0290526.
IF: 2.6, SJR: 0.803, Q1
- II. *LC-MS/MS fingerprinting analysis of Cyanotis arachnoidea extracts: process-related artifacts in anabolic food supplements.* Dávid Laczkó, En-Liang Chu, Ching-Chia Chang, Fang-Rong Chang, Gábor Girst, Tamás Gáti, Gábor Tóth, Árpád Könczöl, Attila Hunyadi **ACS Omega** 2025; 10 (18): 18605-18614.
IF: 4.3, SJR: 0.773, Q1
- III. *Investigation of kaloniszteron and 20-hydroxyecdysone effects in high-fat, high-sugar diet-induced obesity rat model.* Alaa AM Osman, Dávid Laczkó, Máté Vágvölgyi, Adrien Seres-Bokor, Anita Sztojkov-Ivanov, Kata Kira Kemény, Attila Hunyadi, Eszter Ducza **Heliyon** 2025; 11 (3): e42435.
IF: 3.6, SJR: 0.644, Q1