

***Euphorbia* fajok biológiailag aktív vegyületeinek
izolálása és szerkezetmeghatározása**

Doktori értekezés tézisei

Kúsz Norbert

Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2020

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Farmakognózia Program
Programvezető: Prof. Hohmann Judit DSc.

Farmakognóziai Intézet

Témavezetők:

Prof. Hohmann Judit DSc.

Dr. Rédei Dóra Ph.D.

***Euphorbia* fajok biológiailag aktív vegyületeinek izolálása és szerkezetmeghatározása**

Doktori értekezés tézisei

Kúsz Norbert

Szigorlati Bizottság:

Elnök: Prof. Máthé Imre DSc.

Tagok: Prof. Dombi György DSc., Prof. Deli József DSc.

Bíráló Bizottság:

Elnök: Prof. Fülöp Ferenc DSc.

Opponensek: Dr. Béni Szabolcs Ph.D., Dr. Horváth Györgyi Ph.D.

Tagok: Dr. Berkó Szilvia Ph.D., Dr. Gonda Sándor Ph.D.

Szeged

2020

BEVEZETÉS

Az *Euphorbia* (magyarul kutyatej) nemzetség megközelítőleg 1900 faja révén a virágos növények legnagyobbjai közé tartozik. A kutyatejfajok közös ismertetőjegye a tejnedv termelése, ami a különböző szerveket gazdagon behálózó tejsövegekben raktározódik. Korábban több elmélet is született arról, hogy a latex milyen szerepet játszik a növényekben (pl. tápanyagok, víz, vagy az anyagcsere melléktermékeinek tárolása). A napjainkban uralkodó nézet szerint a tejnedv a növények káros exogén ágensekkel szembeni védelmét biztosítja. Ezt a hipotézist támasztja alá az is, hogy a tejnedvben általában jóval magasabb az antimikrobiális, toxikus és irritatív vegyületek (pl. terpenoidok, proteinek) koncentrációja, mint az egyéb növényi részekben.

Az *Euphorbia* fajok népgyógyászati alkalmazása gazdag és hosszú múltra tekint vissza. Számos fajt használtak többek közt bakteriális fertőzések (gonorrhoea, szifilisz) és gasztrointesztinális paraziták ellen, illetve obstipáció, asztma, köhögés, reumatikus fájdalom, kígyómarás, sebek, szemölcsök és egyéb bőrproblémák kezelésére. A tradicionális alkalmazási formák létjogosultságát sok esetben modern farmakológiai vizsgálatok eredményei is alátámasztják.

A makrociklusos diterpének az *Euphorbia* fajok jellegzetes másodlagos anyagcseretermékei. Változatos kémiai szerkezetüknek és ígéretes biológiai aktivitásuknak köszönhetően a vegyületcsoportot kiemelt figyelem övezi a természetes eredetű gyógyszerjelöltek kutatása során. Az elmúlt évtizedekben a kutyatejfajok fitokémiai vizsgálatainak eredményeként több száz új makrociklusos diterpént írtak le. Ezen diterpének bioszintézisének kiindulási vegyületei cembrán alapvázzal rendelkeznek. A cembranoidokból kialakuló ciklikus származékok gyógyászati jelentőségük mellett fontos kemotaxonomiai markereknek is tekinthetők, hiszen előfordulásuk az Euphorbiaceae és Thymeleaceae családokra korlátozódik.

CÉLKITŰZÉSEK

A Szegei Tudományegyetem Farmakognózi Intézetében 1995 óta zajló kutatási program keretében célul tűztük ki négy *Euphorbia* faj, az *E. dulcis* L., az *E. taurinensis* All., az *E. guyoniana* Boiss. & Reut., és az *E. davidii* Subils. fitokémiai és farmakológiai vizsgálatát. A laboratóriumi munka során új, biológiailag aktív makrociklusos diterpének izolálására, azok szerkezetének meghatározására, továbbá kooperációk keretében biológiai aktivitásuk felderítésére törekedtünk. Mindezek érdekében a következő feladatokat végeztük el:

- A növényi nyersanyag szűrővizsgálata diterpén típusú tartalomanyagokra.
- A begyűjtött *Euphorbia* fajok kivonatainak előállítás.
- A vizsgált kutyatej fajok diterpénjeinek izolálása.
- Az izolált vegyületek szerkezetének meghatározása.
- Az izolált vegyületek kemotaxonomiai jelentőségének értékelése.
- Az izolált diterpének, illetve növényi kivonatok farmakológiai aktivitásának tanulmányozása.

ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

A preparatív növénykémiai vizsgálatokhoz az *E. dulcis* (Homoródalmás, Románia), az *E. taurinensis* (Budapest, Magyarország) és az *E. davidii* (Igar, Magyarország) esetében a teljes növények kerültek begyűjtésre. Az *E. guyoniana* föld feletti része Tunézia sivatagos déli területéről (Grand Erg Oriental) származott.

A növények diterpéntartalmának szűrővizsgálata céljából a növényi nyersanyag kisebb részletéből metanolos kivonatokat készítettünk. A betöményített kivonatokat kloroformmal kiráztuk, majd a kloroformos fázisokat poliamidoszlopon metanol és víz csökkenő polaritású elegyeivel eluáltuk. A frakciók tartalmát vékonyrétegekromatográfiával (TLC) ellenőriztük, melynek során a kromatogramokat UV-fény alatt (254 nm) és cc. kénsavas permetezést és hevítést (105 °C) követően

értékeltek. Mivel az *E. guyonianaból* korábban már több diterpént is leírtak, a növény előzetes szűrővizsgálatára nem került sor.

A vegyületek izolálását többlépcsőben, különböző kromatográfiások módszerek (OCC: légköri nyomású oszlopkromatográfia, VLC: vákuum folyadékkromatográfia, PLC: preparatív rétegekromatográfia, HPLC: nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia) kombinációjával végeztük. Állófázisként poliamidot, illetve normál (NP) és fordított fázisú (RP) szilikagélt alkalmaztunk.

Az izolált vegyületek szerkezetének meghatározása nagy felbontású elektro spray ionizációs tömegspektroszkópia (HRESIMS) és mágneses megrezonancia spektroszkópia (NMR) segítségével történt. Az NMR mérések során egy- (^1H , JMOD) és kétdimenziós spektrumokat (HSQC, HMBC, ^1H - ^1H COSY, NOESY) vettünk fel a vegyületekről. A legnagyobb mennyiségben kinyert diterpén (EUD-8, ld. később) abszolút konfigurációját röntgenkristallográfiával határoztuk meg.

Farmakológiai szűrővizsgálathoz *E. davidii* metanolos kivonatából folyadék-folyadék közti megosztással *n*-hexános, kloroformos és etil-acetátos kivonatokat állítottunk elő. A kivont növényi nyersanyagot kíméletes szárítást követően forró vízzel is extraháltuk.

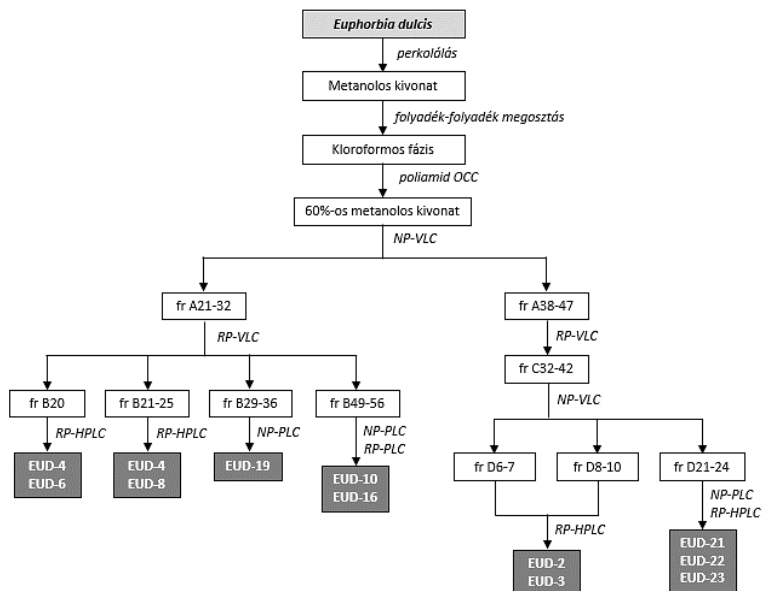
Az izolált diterpének miokardiális K^+ -csatornákra (GIRK – G-fehérje kapcsolt befelé rektifikáló K^+ -csatorna, hERG – gyors késői egyenirányító K^+ -csatorna) kifejtett hatásait a csatornák génjeivel stabilan transzfektált HEK-GIRK1/4 (Kir3.1/3.4) és HEK-hERG (Kv11.1) sejtvonalakon vizsgáltuk. Az ioncsatornákon átfolyó K^+ -áramok intenzitását automatikus patch-clamp készülékkel detektáltuk. A diterpének *in vitro* MDR-moduláló és citotoxikus aktivitását L5178 egér T-limfóma sejteken tanulmányoztuk a rodamin 123 intracelluláris felhalmozódásának mérésével, illetve MTT assay segítségével. Az *E. davidii* kivonatainak antiproliferatív hatását 4 humán daganatos sejtvonalon [HeLa (cervix epitheliális adenokarcinóma), MCF7 (emlő epitheliális adenokarcinóma), A2780 (petefészekkarcinóma), A431 (epidermális karcinóma)] teszteltük MTT-módszerrel.

EREDMÉNYEK

A növények diterpéntartalmának szűrővizsgálata

Az *E. dulcis* és *E. taurinensis* metanolos kivonatát poliamid oszlopon (OCC) frakcionáltuk metanol–víz elegyeivel. Az eluátumok összetételének TLC-s ellenőrzése igazolta a diterpének jelenlétét a növényekben. Tapasztalataink alapján a diterpének a 60%-os metanolos frakciókban dúsultak fel, hiszen előhívást követően csak ennek esetében detektáltuk a diterpénekre jellemző, 0,15–0,70 retenciós faktorú sötétbarna, szürke és fekete foltokat. Az *E. davidii* esetében a diterpének karakterisztikus foltjai egyik frakcióban sem jelentek meg.

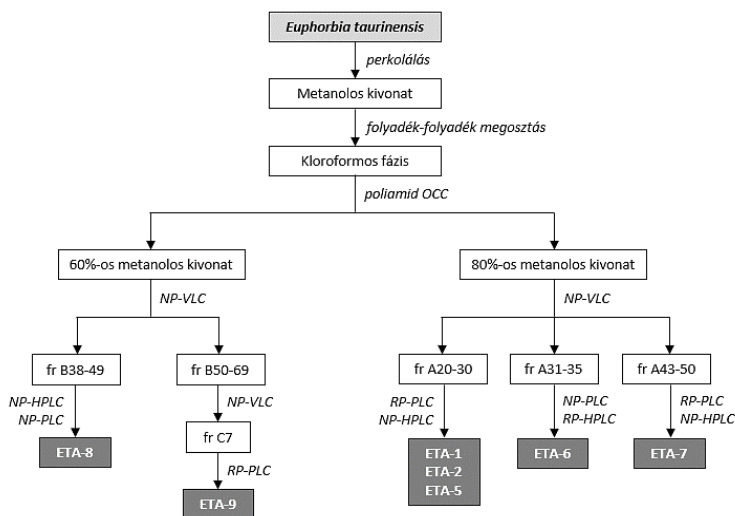
Diterpének izolálása az *E. dulcis*ból



1. ábra. Az *E. dulcis* diterpénjeinek izolálása

A növényi nyersanyag metanolos kivonatát betöményítést követően kloroformmal kiráztuk (1 ábra). Az apoláris fázis OCC-s frakcionálása metanol–víz csökkenő polaritású elegyeivel (3:2, 4:1, 1:0) történt. A frakciók TLC-vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a diterpének a 60%-os metanolos eluátumban dúsultak fel. A diterpénekben gazdag frakció VLC-s szeparálását ciklohexán–etil-acetát–etanol növekvő polaritású elegyeivel végeztük. Az A21-32 és A38-47 alfrakciók komponenseit PLC-vel és HPLC-vel tisztítottuk, és ennek eredményeként 11 diterpént (EUD-2–4, 6, 8, 10, 16, 19, 21–23) izoláltunk.

Diterpének izolálása az *E. taurinensis*ből



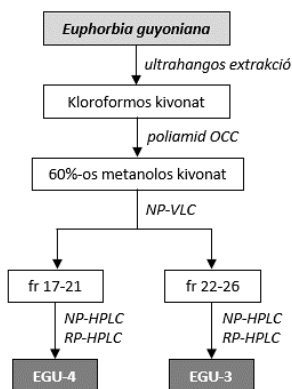
2. ábra. Az *E. taurinensis* diterpénjeinek izolálása

A növény metanolos kivonatát kloroformmal kiráztuk, majd grádiens metanol–víz elúcióval poliamid oszlopon (OCC) frakcionáltuk (2. ábra). A kapott frakciók TLC-s ellenőrzésekor azt tapasztaltuk, hogy nem sikerült szelektív módon feldúsítani a diterpéneket, hiszen azok a 60%-os és a 80%-os metanolos frakcióban is jelen voltak. Elsőként a 80%-os frakció feldolgozását kezdtük meg. A VLC-s elválasztás során

ciklohexán–etil-acetát–etanol gradiens mozgófázist alkalmaztunk, és 70 (A1-70) alfrakciót gyűjtöttünk. Az alfrakciók diterpénjeinek végső tisztítása PLC-vel, majd HPLC-vel történt (**ETA-1, 2, 5–7**). A 60%-os metanolos frakció VLC-s frakcionálása során 80 (B1–80) alfrakcióhoz jutottunk, melyekből VLC, PLC és HPLC segítségével két újabb diterpént sikerült izolálni (**ETA-8, 9**).

Diterpének izolálása az *E. guyonianaból*

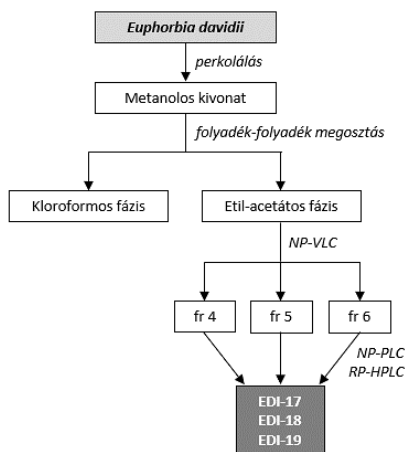
A herba kloroformos kivonatát poliamid állófázison (OCC) frakcionáltuk metanol–víz elegyekkel (3:2, 4:1, 1:0). A preparatív munka következő szakaszában a diterpénekben dús 60%-os metanolos frakcióra fókuszáltunk. A folyadékkromatográfiás (VLC) frakcionáláshoz ciklohexán–etil-acetát–etanol összetételű mozgófázisokat választottunk. A 17-21-es és 22-26-os egyesített alfrakciók főkomponenseit (**EGU-3 és 4**) NP- és RP-HPLC oszlopokon tisztítottuk. Az *E. guyoniana* tartalomanyagainak izolálását a **3. ábra** mutatja be.



3. ábra. Az *E. guyoniana* diterpénjeinek izolálása

Flavonoid-glikozidok izolálása az *E. davidii*ből

A növényi nyersanyag metanolos perkolátumából folyadék-folyadék megosztással kloroformos és etil-acetátos fázist nyertünk (**4. ábra**). Az utóbbi fitokémiai szempontból ígéretesebbnek tűnt, így azt VLC-vel frakcionáltuk etil-acetát-etanol-víz növekvő polaritású elegyeit alkalmazva eluensként. Az elúció során 120 frakciót gyűjtöttünk. A 4-es, 5-ös és 6-os alfrakciók flavonoidjait (**EDI-17–19**) PLC-vel tisztítottuk, majd HPLC-vel választottuk el egymástól.



4. ábra. Az *E. davidii* flavonoidjainak izolálása

Az izolált vegyületek szerkezet-meghatározása

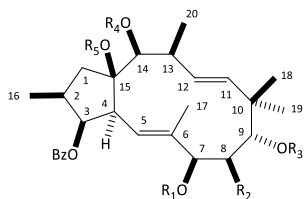
Az izolált vegyületek szerkezetét spektroszkópiai módszerek segítségével határoztuk meg. Tömegspektrometriás vizsgálatokkal megállapítottuk a molekulák tömegét és összegképletét. A szerkezetlevezetés során 1D- és 2D-NMR spektrumok kiértékelésére került sor. Az ^1H NMR, JMOD, ^1H – ^1H COSY, HSQC és HMBC spektrumok alapján megállapítottuk a vegyületek síkbeli szerkezetét, míg a NOESY korrelációk tanulmányozásával meghatároztuk a molekulák relatív konfigurációját.

Az NMR vizsgálatok eredményeként elkészítettük az új vegyületek jellemzésére szolgáló teljes ^1H és ^{13}C jelhozzárendelést. Az **1**-es diterpén (EUD-8) abszolút konfigurációját röntgenkristallográfiai méréssel határoztuk meg.

Az *E. dulcis*ből izolált vegyületek

Az *E. dulcis* metanolos kivonatából 9 új (**1–9**) és 2 ismert (**10**, **11**) jatrofánvázis diterpént izoláltunk. A vegyületek a jatrofánokban ritkán előforduló $\Delta^{(5,6)}$ kettős kötést tartalmaznak a jóval gyakoribb $\Delta^{(6,17)}$ kötés helyett. A molekulák acetyl-, benzoil- és tigloil csoportokkal gazdagon észterezettek. Diterpénjeink csupán a C-3, C-7, C-8, C-9, C-14 és C-15 helyzetű észterező savak számában és anyagi minőségében térnek el egymástól. A **9**-es vegyületben, ami az ismert eufomelliferén B (**10**) szerkezeti izomerje, a C-14-hez egy –OH-csoport kapcsolódik, míg a C-15-ön lévő hidroxilcsoportot egy ecetsav észterezi. Ilyen szubsztitúciós mintázattal rendelkező jatrofánvázis diterpének ritkán fordulnak elő a természetben.

Az *E. dulcis* diterpénjei sztereokémiaiilag egységes sorozatot alkotnak. A biciklo[10.3.0]pentadekán gyűrűrendszerben a ciklopentán gyűrű és a 12-tagú makrociklus mindig *transz* anellációjú, 7β , 8β , 9α , 14β , és 15β acil vagy –OH funkciók csoportokkal szubsztituált, továbbá a 2-es és 13-as helyzetű metilciklo β térállásúak. Az **1**-es és **11**-es vegyületek csak annyiban képeznek ez alól kivételt, hogy a 8-as helyzetben nem tartalmaznak szubsztituenst. A csatolási állandók mintázatából és a diagnosztikus NOE-korrelációk meglétéből arra a következtetésre jutottunk, hogy a diterpének oldatban *endo*-konformációt vesznek fel. Az *endo*-típusú konformerekben a C-6-hoz kapcsolódó metilcsoport merőleges a makrociklus síkjára, a H-4 és H-5 pedig egymáshoz viszonyítva *transz* (antiperiplanaris) térállású. Az **1**-es vegyület abszolút konfigurációját röntgenkristallográfiai méréssel határoztuk meg. A kristályok aszimmetrikus egységeiben 3 kristallográfiaiilag különböző, de kémiaiilag azonos konformert azonosítottunk, melyek abszolút konfigurációja **2S**, **3S**, **4S**, **7R**, **9R**, **13S**, **14S**, és **15R**.

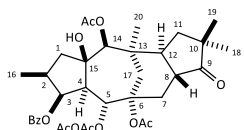


	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅
1 (EUD-8)	Tig	H	Ac	Ac	H
2 (EUD-4)	Tig	OAc	Ac	Ac	H
3 (EUD-19)	Tig	OAc	Ac	Tig	H
4 (EUD-16)	H	OAc	Ac	Tig	H
5 (EUD-10)	H	OAc	Ac	Ac	H
6 (EUD-23)	Ac	OH	Ac	Ac	H
7 (EUD-21)	Ac	OH	H	Ac	H
8 (EUD-22)	H	OH	H	Ac	H
9 (EUD-3)	Ac	OAc	Ac	H	Ac
10 (EUD-2)	Ac	OAc	Ac	Ac	H
11 (EUD-6)	Ac	H	Ac	Ac	H

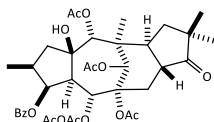
Az *E. taurinensis*ből izolált vegyületek

Az *E. taurinensis* metanolos kivonatának feldolgozása során két új (**12**, **13**) és öt ismert (**14–18**) diterpént izoláltunk. Az új természetes vegyületek a szegetán- (**12**) és jatrofánváz (b) diterpének családjába tartoznak, míg az ismert származékokat szegetán- (**14**), jatrofán- (**15**) és ingenánváz (b) diterpéneként azonosítottuk. A szegetánok a makrociklusos diterpének egy igen ritka és specifikus csoportját alkotják, amit mi sem bizonyít jobban, mint hogy munkánkat megelőzően mindössze tizenkét ilyen vegyületet írtak le négy kutyatejféjéből (*E. segetalis*, *E. paralias*, *E. peplus* és *E. portlandica*). A tetracyklos szegetánváz magában foglal egy különleges biciklo[4.3.1]dekán szerkezeti elemet. A korábban ismert szegetánváz

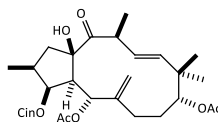
diterpének többségétől eltérően a **12**-es vegyület egy β -térállású acilcsoportot tartalmaz a 14-es helyzetben, és a C-17 nem szubsztituált. A két izolált szejtánra jellemző továbbá a C-5-höz kapcsolódó ritka acetoxiacetil csoport.



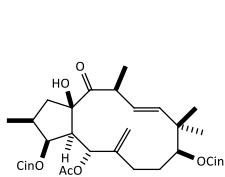
12 (ETA-8)



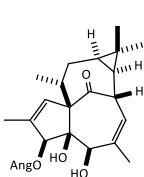
14 (ETA-9)



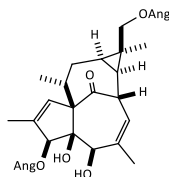
13 (ETA-6)



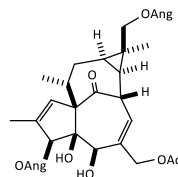
15 (ETA-5)



16 (ETA-1)



17 (ETA-2)

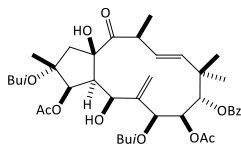


18 (ETA-7)

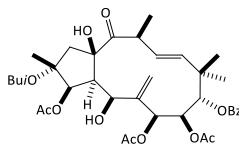
A jatrófánvázus **13**-as vegyületben egy C-9-es α -acetyl csoport található, míg a **15**-ösben egy β -helyzetű cinnamoil kapcsolódik a vázhoz ugyanezen pozícióban. A csatolási állandók és NOE kölcsönhatások elemzése azt bizonyítja, hogy mindkét jatrófán esetében oldott állapotban – az *E. dulcis* diterpénjeihez hasonlóan – az *endo*-típusú konformáció a kedvezményezett.

Az *E. guyonianából* izolált vegyületek

Az *E. guyoniana* kloroformos kivonatából két új (**19** és **20**) jatrófánvázus diterpént azonosítottunk. A vegyületeket ecet-, benzoe-, illetve izovajsav észterezte. A két vegyület csupán a C-7-en kapcsolódó szubsztituensben tér el egymástól: a **19**-es diterpénben egy izobutil-, a **20**-asban pedig egy acetilcsoport található.



19 (EGU-4)

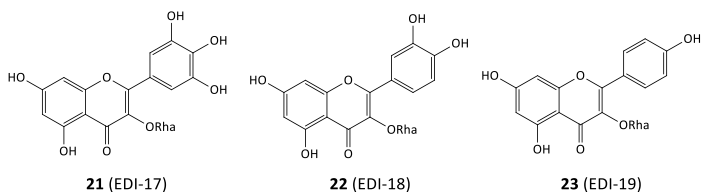


20 (EGU-3)

A növényből más kutatócsoportok által leírt jatrófánokhoz hasonlóan vegyületeink a C-2-es helyzetben lévő hidroxilcsoportja észterezett, a C-14-en pedig ketocsoportot tartalmaznak. A csatolási állandók, valamint a NOE kölcsönhatások irodalmi adatokkal való összevetése által megállapítottuk, hogy mindkét jatrófán oldatbeli domináns konformációja *exo*-típusú, ami a makrociklus síkjával párhuzamos 6(17)-exometilénnel jellemezhető.

Az *E. davidii*ből izolált vegyületek

Az *E. davidii* metanolos kivonatának etil-acetátos fázisából három ismert flavonoid-glikozidot izoláltunk. A fenolos vegyületek ¹H és ¹³C kémiai eltolódásai teljes mértékben megegyeztek a miricetin 3-*O*-ramnozid (**21**), kvercetin 3-*O*-ramnozid (**22**) és kempferol 3-*O*-ramnozid (**23**) irodalmi értékeivel.



Kemotaxonomiai vonatkozások

Az *E. dulcis*ből izolált jatrófánvázas diterpénekben a 6(17)-exometilén csoport helyett a sokkal ritkább $\Delta^{(5,6)}$ helyzetű kettős kötést találhatók. A $\Delta^{(5,6)}$ kettős kötést tartalmazó jatrófánokat pár kivételtől eltekintve az *Esula* szubgénuszba tartozó kutyatejfajokból írták le. Az eddigi irodalmi adatok fényében elképzelhető, hogy a kettős kötés jelenléte ebben a kitüntetett pozícióban kemotaxonomiai jelentőséggel bír.

A szegetán diterpének jelenléte az *E. taurinensis*ben összhangban áll a növény újabb rendszertani besorolásával. Az *E. taurinensis* diterpénösszetétele alapján szoros rokonságot mutat az *E. segetalisszal* és az *E. paraliasszal*, hiszen főbb diterpén komponensei közül a **15**-ös és **18**-as az *E. segetalis*ban is megtalálható, míg a **14**-es,

16-os és 17-es diterpéneket munkánkat megelőzően az *E. segetalis*ből és az *E. paralias*ból egyaránt izolálták.

Az *E. guyoniana* fitokémiai vizsgálata során Tunéziában gyűjtött herbát dolgoztunk fel, míg a korábbi közleményekben algériai eredetű mintákat vizsgáltak a kutatócsoportok. Szerkezeti analógiáik ellenére a két izolált diterpén (**19 és 20**) nem volt azonos a növényből már leírt jatrofánokkal, ami az *E. guyoniana* populációinak jelentős kémiai diverzitására utal.

Az *E. davidii* legújabb besorolása alapján a *Chamaesyce* szubgénusz *Poinsettia* szekciójában kapott helyet. A diterpének nem tartoznak a szubgénusz jellegzetes tartalomanyagai közé, eddig csupán az *Anisophyllum* szekció pár fajából írták le sporadikus előfordulásukat. Ez magyarázatul szolgálhat arra, hogy miért nem találtunk diterpéneket az *E. davidii*ben.

Az *E. taurinensis* és az *E. davidii* tartalomanyagait munkánkat megelőzően még nem vizsgálták; valamennyi diterpént és flavonoid-glikozidot elsőként mutattuk ki a négy feldolgozott növényből.

Az izolált diterpének és növényi kivonatok biológiai aktivitása

Az izolált diterpének ioncsatornagátló hatása

Annak ellenére, hogy már több száz, a kutyatej fajokra jellemző makrociklusos diterpént ismerünk, a szívizomzatra kifejtett hatásaikról nagyon kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésünkre. A diterpének pitvari és kamrai ioncsatornákat gátló aktivitását célzó vizsgálatok előzménye, hogy Vasas és mtsai. leírták az *E. falcata* mirzinán, premirzinán és ciklomirzinán típusú diterpénjeinek szelektív GIRK-gátló aktivitását. A kísérlet során GIRK proteineket stabilan expresszáló HEK-GIRK1/4-sejtekhez hozzáadtuk az **1–12** és **15–20** diterpéneket 1 μM -os és 10 μM -os koncentrációban, majd megmértük a csatornákon átfolyó K^+ -áramok intenzitását. A tesztelt diterpének többsége 10 μM -os koncentrációban szignifikáns mértékben gátolta a GIRK-membránproteinek működését, egyes jatrofánok és ingenánok pedig

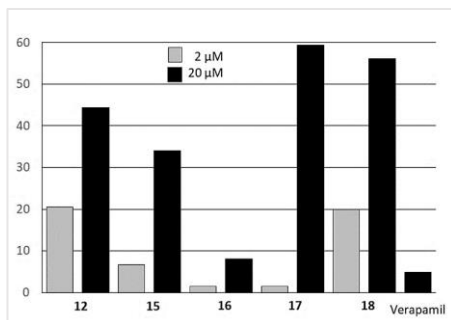
még az 1 μM -os tartományban is számottevő aktivitást mutattak. Meghatároztuk a leghatásosabb diterpének IC_{50} értékeit (**1**: $1.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$, **2**: $1.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$, **9**: $3.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$, **10**: $1.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$, **11**: $2.6 \pm 0.5 \mu\text{M}$, **16**: $12.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$, **17**: $1.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$), majd HEK-hERG-sejteken is leteszteltük őket annak érdekében, hogy bővíthessük ismereteinket a makrociklusos diterpének potenciális kardiotoxikus mellékhatásairól. A jatrofánvázas diterpének egyike sem interferált számottevő mértékben a hERG-proteinek működésével, azonban a **17**-es ingenán esetében a csatornákon áthaladó K^+ -áram intenzitásának szignifikáns csökkenését figyeltük meg.

Munkacsoportunk elsőként vizsgálta a jatrofán-, szegetán- és ingenánvázas diterpének GIRK- és hERG-csatornagátló aktivitását. Mivel a vegyületek szubsztitúciós mintázata, valamint a GIRK-csatornagátló aktivitása közt nem találtunk szoros összefüggést, nem nyílt módunk szerkezet-hatás összefüggések levezetésére. Fontosnak tartjuk a terület további kutatását, hiszen ezáltal mélyebb betekintést nyerhetünk abba, hogy az *Euphorbia*-diterpének szerkezeti sajátosságai milyen módon befolyásolják interakcióikat a gyógyászati szempontból fontos GIRK- és hERG-proteinekkel. A jelenleg forgalomban lévő, pitvari aritmiák kezelésére szánt antiaritmiás farmakonokkal kapcsolatos problémák (pl. a pitvari szelektivitás hiányából adódó mellékhatások) miatt folyamatos igény mutatkozik újabb, szelektívebb gyógyszerek kifejlesztésére. A jatrofánvázas diterpének erős és szelektív GIRK-gátló aktivitásukból kifolyólag modellként szolgálhatnak a természetes eredetű vezérmolekulák célzott kutatásához.

Az E. taurinensis diterpénjeinek MDR-moduláló és citotoxikus hatása

A makrociklusos *Euphorbia* diterpének a daganatos sejtek multidrog rezisztenciáját mediáló transzporterek (pl. P-glikoprotein) régóta ismert hatékony gátlószerei. Farmakológiai vizsgálataink részeként megvizsgáltuk az *E. taurinensis*-ből izolált diterpének MDR-moduláló és citotoxikus aktivitását. Amint azt az **5. ábra** mutatja, a **12**-es szegetán és két ingenán diterpén (**17**, **18**) *in vitro* kiemelkedő hatékonysággal

rendelkezett, hiszen 20 μM -os koncentrációban a pozitív kontrollként használt verapamilnál jóval nagyobb mértékben gátolták a P-glikoproteinek effluxpumpa-funkcióját.



5. ábra. Az *E. taurinensis*-ből izolált diterpének efflux puma gátló hatása

A diterpének citotoxikus hatását és szelektivitását egerekből nyert szenzitív és MDR T-sejtes limfóma sejtvonalakon tanulmányoztuk. A szejtánok és jatrofánok nem mutattak citotoxikus aktivitást sem az érzékeny, sem a rezisztens sejtvonalon. Velük ellentétben a **17-es** és **18-as** ingenánvázas diterpének mindkét sejtvonalon toxikusnak bizonyultak. Számított IC_{50} értékeik alapján a **17-es** vegyület nem volt szelektív, míg a **18-as** diterpén nagyobb szelektivitást mutatott az MDR sejtvonal irányába. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az ingenánvázas diterpének 17-es helyzetű észtercsoporttal való szubsztitúciója növeli a vegyületek citotoxikus aktivitását.

Az E. davidii kivonatainak antiproliferatív aktivitása

A növényi nyersanyagból készült *n*-hexános és kloroformos extraktumok dóziszfüggő módon gátolták mind a négy daganatos sejtípus proliferációját. A flavonoidokban gazdag etil-acetátos kivonat nem mutatott aktivitást egyik sejtvonal esetében sem.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet és nagyrabecsülésemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, *Hohmann Judit* professzor asszonynak és *dr. Rédei Dórának*, hogy szakmai tudásuk legjavával, kifogyhatatlan optimizmusukkal, az irányomban tanúsított emberségükkel és jóindulatukkal segítették a doktori munkámat és az értekezés megírását.

Hálás vagyok *dr. Jakab Gusztávnak*, *dr. Barina Zoltánnak*, *Mohamed Chaieb* professzor úrnak és *Pinke Gyula* professzor úrnak a növények begyűjtéséért és azonosításáért; *dr. Forgó Péternek* az NMR-, *Csorba Attilának* pedig a HRMS-mérésekért; *dr. Bombicz Petrának*, *dr. Bereczki Krisztinának* és *dr. Pierre Ferteynek* a röntgenkristallográfiai mérések elvégzéséért és az abszolút konfiguráció meghatározásáért.

Köszönettel tartozom *dr. Orvos Péternek* a vegyületeink GIRK- és HERG-csatornákon való teszteléséért, *dr. Kincses Annamáriának*, *dr. Spengler Gabriellának* és *dr. Burián Katalinnak* a diterpének MDR-moduláló és citotoxikus aktivitásának, illetve *dr. Zupkó Istvánnak* a növényi kivonatok antiproliferatív hatásának vizsgálatáért.

Köszönöm az SZTE Farmakognóziái Intézet valamennyi munkatársának, hogy olyan családias és inspiráló légkört teremtettek, ami segített abban, hogy a legjobbat tudjam kihozni magamból. Külön köszönöm *Berta Erzsébetnek* és *Nagy Annának* a laboratóriumi munkámban nyújtott készséges segítségüket. Köszönöm *dr. Dankó Balázsnak*, hogy megtanította az NMR-készülék használatát és az NMR-spektrumok szoftveres kiértékelését. Köszönettel tartozom *dr. Vasas Andreának*, *dr. Veres Katalinnak* és *dr. Csupor Dezsőnek*, hogy kedvességükkel, szakmai tanácsaikkal és folyamatos pozitív visszajelzéseikkel segítették a szakmai előrehaladásomat. Köszönettel tartozom *dr. Bokor Dórának* a disszertációm angol nyelvű lektorálásáért. Végezetül szeretném megköszönni páromnak, *dr. Fekete Fanninak*, a családomnak és a barátaimnak is azt a hatalmas érzelmi támogatást, megértést és bizalmat, ami segített a kutatómunkám hosszú éveit túljutni minden nehézségen.

A kutatást a GINOP-2.3.2-15-2016-00012 azonosító számú „Új utak a természetes anyag alapú gyógyszerkutatásban: Rendszermetabolomikai megközelítések növényi és mikrobiális eredetű bioaktív terpenoidok felkutatására” című projekt támogatása, melyet ezúton is szeretnék megköszönni.

A TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:

1. **Kúsz N**, Orvos P, Bereczki L, Fertey P, Bombicz P, Csorba A, Tálosi L, Jakab G, Hohmann J, Rédei D.
Diterpenoids from *Euphorbia dulcis* with potassium ion channel inhibitory activity with selective G protein-activated inwardly rectifying ion channel (GIRK) blocking effect
Journal of Natural Products **2018**, 81: 2483-2492. If: 4,257
2. Rédei D, **Kúsz N**, Sántori G, Kincses A, Spengler G, Burián K, Barina Z, Hohmann J.
Bioactive segetane, ingenane, and jatrophone diterpenes from *Euphorbia taurinensis*
Planta Medica **2018**, 84: 729-735. If: 2,746
3. **Kúsz N**, Orvos P, Csorba A, Tálosi L, Chaieb M, Hohmann J, Rédei D.
Jatrophone diterpenes from *Euphorbia guyoniana* are new potent inhibitors of atrial GIRK channels
Tetrahedron **2016**, 72: 5724-5728. If: 2,651
4. **Kúsz N**, Szabó M, Pinke Gy, Zupkó I, Hohmann J.
First phytochemical investigation of secondary metabolites of *Euphorbia davidii* Subils. and antiproliferative activity of its extracts
Acta Biologica Hungarica **2015**, 66: 464-467. If: 0,605

ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK:

1. **Kúsz N**, Rédei D, Dankó B, Hohmann J.
Euphorbia dulcis, az ígéretes diterpénforrás – Egy szűrővizsgálat eredményei
Fiatal Gyógynövénykutatók Fóruma
Budakalász, 2014. február 14.
2. **Kúsz N**, Dankó B, Pinke Gy, Jakab G, Rédei D, Hohmann J.
Phytochemical investigation of *Euphorbia dulcis* and *Euphorbia davidii*
Trends in Natural Products Research 2014 : Young Scientists Meeting
Csehország, Olomouc, 2014. június 23-25.
3. Rédei D, **Kúsz N**, Forgó P, Dankó B, Hohmann J.
New jatrophone diterpenes from *Euphorbia dulcis*
22nd Conference on Isoprenoids
Csehország, Prága, 2014. szeptember 7-10.
4. **Kúsz N**, Forgó P, Hohmann J, Rédei D.
Az *Euphorbia dulcis* diterpénjeinek izolálása és szerkezetmeghatározása
Az MTA Szteroid és Terpenoidkémiai Munkabizottság és az MTA Szegedi
Akadémiai Bizottság Szerves és Gyógyszerkémiai Munkabizottság előadói ülése
Szeged, 2014. október 31.
5. Rédei D, **Kúsz N**, Chaieb M, Hohmann J.
Two new jatrophone diterpenes from *Euphorbia guyoniana*
63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal
Plant and Natural Product Research (GA2015)
Budapest, 2015. augusztus 23-27.
6. **Kúsz N**, Rédei D, Orvos P, Tálosi L, Jakab G, Hohmann J.
Isolation and structure determination of novel jatrophone diterpenes from
Euphorbia dulcis and their GIRK-channel-inhibitory activity
63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal
Plant and Natural Product Research (GA2015)
Budapest, 2015. augusztus 23-27.

7. **Kúsz N**, Orvos P.
Az *Euphorbia dulcis*ből izolált jatrófánvázas diterpének szerkezetmeghatározása és GIRK-csatorna gátló hatásának vizsgálata
Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, XII. Clauder Ottó Emlékverseny
Budapest, 2016. október 20-21.
8. **Kúsz N**, Sátori G, Kincses A, Spengler G, Barina Z, Hohmann J, Rédei D.
Novel MDR-modulating diterpenes from *Euphorbia taurinensis*
65th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA2017)
Svájc, Bazel, 2017. szeptember 3-7.
9. **Kúsz N**, Sátori G, Rédei D, Hohmann J.
Az *Euphorbia taurinensis* diterpénjeinek szerkezetmeghatározása NMR spektroszkópiával
Az MKE NMR Szakcsoport és MTA NMR Munkabizottság együttes ülése
Balatonszemes, 2017. október 16-17.
10. Kincses A, Sátori G, **Kúsz N**, Mosolygó T, Burián K, Hohmann J, Rédei D, Spengler G.
Anticancer activity of diterpenes isolated from *Euphorbia taurinensis*
5th Central European Forum for Microbiology
Keszthely, 2017. október 18-20.
11. **Kúsz N**, Rédei D, Csorba A, Hohmann J.
Változatos szerkezetű diterpének izolálása *Euphorbia* fajokból
Az MTA Szteroid és Terpenoidkémiai Munkabizottságának előadóülése
Szeged, 2017. november 27.

