

**Polygonaceae fajok farmakológiai szűrővizsgálata és a *Rumex aquaticus* L. és
Rumex thyrsoiflorus Fingerh. biológiailag aktív vegyületeinek izolálása**

Doktori értekezés tézisei

dr. Orbán-Gyapai Orsolya

Szegedi Tudományegyetem
Farmakognóziái Intézet

Szeged

2017

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Farmakognózia PhD program
Programvezető: Prof. Dr. Hohmann Judit DSc

Farmakognóziai Intézet
Témavezetők:
Prof. Dr. Hohmann Judit DSc
Dr. Vasas Andrea PhD

**Polygonaceae fajok farmakológiai szűrővizsgálata és a *Rumex aquaticus* L. és
Rumex thyrsoiflorus Fingerh. biológiailag aktív vegyületeinek izolálása**

Doktori értekezés tézisei

dr. Orbán-Gyapai Orsolya

Szigorlati Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Máthé Imre DSc

Tagok: Prof. Dr. Kéry Ágnes PhD, Dr. Zupkó István PhD

Bírálati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Soós Gyöngyvér PhD

Opponensek: Dr. Horváth Györgyi PhD, Dr. Lázár László PhD

Tag: Dr. Vasas Gábor DSc

Szeged

2017

BEVEZETÉS

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) adatai szerint a 2015-ben bekövetkezett 56,4 millió elhalálozás több mint fele (54%) a 10 leggyakoribb halálok valamelyikéhez köthető. Az ischaemiás szívbetegségek és a sztrók már 15 éve a vezető halálokok között szerepelnek. A harmadik helyen az alsó légúti infekciók állnak, ezt követik a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), tüdőrák, diabétesz, demencia, fertőzések-hasmenéses betegségek, tuberkulózis és a közúti balesetek.

Az antibiotikum-rezisztencia ma az egyik legnagyobb közegészségügyi kockázat a világon. A helytelen, túlzott, illetve indokolatlan antibiotikum használat miatt olyan baktériumok jelentek meg, amelyek ellenállnak a különböző gyógyszereknek. Ennek következtében ugrásszerűen nő a kórházi ellátásban részesülők között is az elhalálozások száma. A WHO adatai szerint a kórházi ellátásban részesülők 5-10%-a kap nozokomiális fertőzést, amelynek egyik leggyakoribb oka a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA), amely sebfertőzéseket, alsó légúti és húgyúti infekciókat illetve szepszist okozhat. Az intenzív ellátásban gyakoribbak a súlyos fertőzések, főleg az idősebbeknél, ezzel meghosszabbítva a kórházi tartózkodást és növelve a terápiás költségeket. Az MRSA mellett más baktériumok is okozhatnak nozokomiális fertőzést, például a *Staphylococcus epidermidis*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* és a *Klebsiella pneumoniae*.

A xantinoxidáz (XO) jelentős mennyiségben van jelen a gasztrointesztinális rendszerben valamint a májban, és a purin-lebontásáért (adenin/guanin- hipoxantin/xantin átalakulást katalizálja húgysavvá) felelős, amelynek során reaktív oxigén gyökök képződnek. Ezek közül az O_2^- gyök több patológias folyamatban is részt vesz; fontos szerepet játszik az ischaemiás és egyéb típusú érrendszeri károsodások, gyulladásos megbetegedések, sztrók, diabetes mellitus, reumás betegségek, májfunkció-eltérések, veseelégtelenség és a krónikus szívelégtelenség kialakulásában. Ezen kívül a megemelkedett húgysavszint köszvény kialakulásához is vezethet. Az XO inhibitorok meggátolják a túlzott húgysavképződést és emellett gyulladáscsökkentő tulajdonságuknak köszönhetően a gyulladásos folyamatok okozta tüneteket is enyhíteni képesek.

A sztrók a második vezető halálok a 60 év felettiek körében és milliók szenvednek maradandó károsodást (pl. látás- és/vagy beszédképesség elvesztése, paralízis, zavartság).

Kezelésére jelenleg az egyetlen hatékony szer az intravénásan adandó szöveti plazminogén aktivátor, amelynek alkalmazása szűk terápiás ablaka miatt (a sztrók kialakulását követő első 3 óra) nagymértékben korlátozott. A kórkép súlyossága, illetve a terápiás rés indokolttá teszi, elsősorban preventív jellegű és/vagy a felépülést segítő, neuroprotektív hatású anyagok kutatását.

A növényi és egyéb természetes eredetű vegyületek szerepe a gyógyászatban már az ókor óta ismert. A növények régóta fontos szerepet játszanak különböző betegségek kezelésében és több, a nyugati gyógyászatban alkalmazott gyógyszer hatóanyaga (pl. atropin, morfin, kinin és digitoxin) visszavezethető az anyanövény tradicionális alkalmazására.

A Polygonaceae család fajaira jellemző a biológiailag aktív másodlagos anyagcseretermékek (pl. antrakinon-, naftalin-, stilbén- és flavonoidszármazékok) szintézise és felhalmozása. A növények föld feletti részeit (levél, virág, termés) és gyökerét egyaránt felhasználja a tradicionális gyógyászat különböző betegségek, pl. infekciók, gyulladás, hasmenés, székrekedés, enyhe diabétesz vagy sárgaság kezelésére. Tartalomanyagaik és gyógyászati jelentőségük miatt kiemelkedő jelentőségűek a *Rumex* nemzetség tagjai. A fajokból számos vegyületet izoláltak és tesztelték a kivonatok illetve a tiszta anyagok *in vitro* és *in vivo* (gyulladáscsökkentő, antioxidáns, antitumor, antibakteriális, antivirális és antifungális) hatását.

CÉLKITŰZÉSEK

A Szegedi Tudományegyetem Farmakognóziái Intézetében néhány évvel ezelőtt vizsgálatok kezdődtek a Polygonaceae fajokban előforduló, biológiailag aktív természetes vegyületek felkutatása céljából. Ennek keretében – a szűrővizsgálati program folytatásaként – elsőként a Polygonaceae családba tartozó növényfajok farmakológiai vizsgálatával foglalkoztam. Ezen kívül feladatomból volt két kiválasztott *Rumex* faj részletes fitokémiai és farmakológiai analízise.

Munkám során célul tűztem ki:

- A *Rumex* nemzetségbe tartozó fajok fitokémiájával és farmakológiájával kapcsolatos szakirodalom áttekintését.

- A begyűjtött Polygonaceae fajok különböző polaritású oldószerekkel készített kivonatainak előállítását és azok xantin-oxidáz (XO) enzim működését gátló illetve antibakteriális hatásának vizsgálatát.
- A *Rumex aquaticus* biológiailag aktív szekunder metabolitjainak azonosítását: izolálás, szerkezetmeghatározás, kivonatok és komponensek *in vitro* antibakteriális, XO-gátló és neuroprotektív potenciáljának meghatározása.
- A *Rumex thyrsoiflorus* fitokémiai és farmakológiai vizsgálatát: komponensek izolálása, szerkezetmeghatározása, valamint a növény kivonatainak és vegyületeinek *in vitro* antibakteriális hatásvizsgálata.

ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

A szűrővizsgálathoz valamint a preparatív növénykémiai vizsgálathoz a Polygonaceae fajokat a Kárpát-medence különböző területeiről (Magyarország és Románia) 2010. június és szeptember között (illetve a *R. aquaticus* 2012 júliusában) gyűjtöttük.

A szárított növényi részeket metanollal perkoláltuk, majd a betöményített kivonatokot vízzel elegyítettük. Ezt követően először *n*-hexánnal majd kloroformmal extraháltuk. A szűrővizsgálathoz a növényekből forró vizes kivonatokot is készítettünk.

A vegyületek tisztítását többlépcsős kromatográfiás eljárás segítségével végeztük el, oszlop folyadékkromatográfiát (CC), vákuum folyadékkromatográfiát (VLC), centrifugális megoszlásos kromatográfiát (CPC), rotációs planárokromatográfiát (RPC), közepes nyomású folyadékkromatográfiát (MPLC), preparatív rétegekromatográfiát (PrepTLC), géliszűrést (GF) és nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC) alkalmazva. Állófázisként normál és fordított fázisú szilikagél illetve Sephadex LH-20 gélt használtunk.

Az izolált vegyületek szerkezetmeghatározása különböző spektroszkópiai módszerek (NMR, MS) segítségével történt.

A *Rumex* fajok különböző növényi részeiből készült kivonatok antibakteriális hatását korongdiffúziós modellel határoztuk meg. Ennek során a vizsgált növényi minták és a *R. aquaticus*-ból izolált vegyületek adott koncentrációjú oldatával (oldószerként DMSO-t használva) átitatott papírkorongokat az előzőleg megfelelő koncentrációjú baktérium szuszpenzióval (*S. aureus*, meticillin-rezisztens *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*,

M. catarrhalis, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* és *K. pneumoniae*) egyenletesen leoltott tápagar lemezek felületére helyeztük és vizsgáltuk a mikroba érzékenységét vagy rezisztenciáját. A papírkorongból a táptalajba diffundáló anyagok hatására az érzékeny mikrobák esetében a korong körül feltisztulási zóna jön létre, míg a rezisztens baktériumok az antibiotikum jelenlétében is szaporodni fognak. Az aktív kivonatok kromatográfiás feldolgozása során mind az alfrakciókat, mind az izolált vegyületeket hasonlóképpen vizsgáltuk, majd az aktivitást mutató anyagok MIC (minimum inhibitory concentration = minimális gátló koncentráció) értékét mikrodilúciós módszerrel (96-lyukú plate-en) határoztuk meg.

Az *in vitro* XO-gátló hatás méréséhez a Sigma-Aldrich által kidolgozott protokollt módosítottuk az általunk használt spektrofotométer specifikációinak figyelembe vételével. A mérés elméleti háttere a xantin-húgysav átalakuláson alapszik, amelynek katalizátora a XO enzim. Referencia anyagként allopurinolt alkalmaztunk. A vizsgált kivonat, illetve vegyület a XO-gátláson keresztül a húgysav termelődését gátolja, így csökkentve az abszorbanciát. A detektálás 290 nm-en 3 percig történt, FluoSTAR OPTIMA (BMG LABTECH) spektrofotométer használatával. A tesztelt anyagok hatékonyságát az idő-abszorbancia tengelyen felvett görbe meredekségének változása jelzi. Az eredmények kiértékelése GraphPad 6.0 szoftver segítségével történt.

A különböző vegyületek neuroprotektív hatásvizsgálatára számos *in vitro* kísérleti modellt dolgoztak ki, amelyek közül a legmegbízhatóbb a széles körben alkalmazott oxigén-glükóz depriváció (OGD), mivel ezzel a módszerrel nem csak a vérellátás megszakadását és az oxigén-, valamint a tápanyag-ellátottság csökkenését, hanem a reperfüzió során fellépő károsító (gyulladásos és oxidatív) folyamatokat is nyomon lehet követni. A *R. aquaticus* föld feletti részéből izolált két flavonoid-glikozid neuroprotektív hatásvizsgálatának során patkány mellékvese pheochromocytoma sejtvonalat (PC12) alkalmaztunk, amelyet RPMI közegben 37 °C-on, 5%-os CO₂ szint mellett inkubáltunk. A vegyületek neuroprotektív hatásának méréséhez a PC12 sejtek tenyészközegét HBSS médiára cseréltük, amely az RPMI közegtől eltérően nem tartalmaz tápanyagot, azaz glükózt. Ezután a sejteket a tesztvegyületekkel (10 μM) kezeltük, majd anaerob körülmények között inkubáltuk 1,5 órán keresztül. OGD során a sejtek károsodása következik be, csökken a mitokondriális transzmembrán-potenciál, amely citokróm-c

felhalmozódáshoz vezet, ami aktiválja a kaszpáz-3 enzimrendszert. Emellett szabadgyök-gépződés és ezzel összefüggő glutation-kimerülés figyelhető meg. A sejtek életképességét – mitokondriális aktivitásuk alapján – MTT assay segítségével határoztuk meg.

A neurit-növekedési assay során a PC12 sejteket poli-L-lizinnel előkezelt steril fedőlemezre kötve 6 mintahelyes plate-en differenciáltuk DMEM mediában, 100 ng/ml Idegnövekedési-faktor (NGF) hozzáadásával. Az NGF-t kétnaponta cseréltük és a sejteket 5-7 nappal a kezelés megkezdése után differenciálódottnak tekintettük. A differenciálódott sejteket a tesztvegyületek hozzáadását követően OGD indukálta sejthalál modellen vizsgáltuk, a fentebb említett módon. Azt OGD-t egy, a reperfüziót imitáló 24 órás inkubáció követte glükóz- és oxigéndús közegben. Ezután a sejteket fixáltuk 4%-os paraformaldehiddel, majd a permeabilitásukat növeltük 0,3%-os Triton X-100-at tartalmazó PBS pufferrel. Ezután a sejteket inkubáltuk 1% marhaszérum albuminnal majd mosás után kezeltük nyúl anti-szinaptofizin primer antitesttel, amelyet kecske anti-nyúl szekunder antitest követett. Ezután egy neuronális markerrel (falloidin), valamint egy sejtmag-markerrel (DAPI) való kezelést követően fluorescens mikroszkóppal felvételeket készítettünk. A neuritek nyúlványainak hosszúságát NeuriteTracer program segítségével analizáltuk.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

***Rumex* fajok antibakteriális hatásának szűrővizsgálata**

A *Rumex* nemzetségbe tartozó növényeket világszerte alkalmazzák a tradicionális gyógyászatban, többek között baktériumok okozta bőr- és bélfertőzések kezelésére. A szűrővizsgálat során 14, a Kárpát-medencében honos, a *Rumex* nemzetségbe tartozó növényfajt vizsgáltunk *S. epidermidis*, *S. aureus*, MRSA, *B. subtilis*, *M. catarrhalis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* és *K. pneumoniae* törzseken. Az összesen 73 kivonat *n*-hexánnal (A), kloroformmal (B), vizes-metanollal (C), valamint forró vizes kivonással készült (D) a növények különböző részeiből. Legmagasabb antibakteriális aktivitást (gátlási zóna > 15 mm) a növények gyökereiből készült *n*-hexános és kloroformos kivonatok mutattak 50 mg/ml koncentrációban. Az aktív frakciók közül három *n*-hexános kivonat (a *R. alpinus*, *R. aquaticus* és *R. patientia* gyökerének kivonata *S. aureus* ellen, valamint a *R. alpinus* gyökerének kivonata MRSA

ellen), négy kloroformos kivonat (*R. acetosa* gyökér *S. epidermidis* és *S. aureus* ellen; *R. conglomeratus* herba *M. catarrhalis* ellen; *R. crispus* gyökér *S. pneumoniae* ellen; *R. pulcher* teljes növény *B. subtilis* ellen) és két vizes-metanolos kivonat (*R. crispus* herba és *R. patientia* virágzat *S. epidermidis* ellen) mutatott kiemelkedő aktivitást.

Rumex fajok XO gátló hatásának szűrővizsgálata

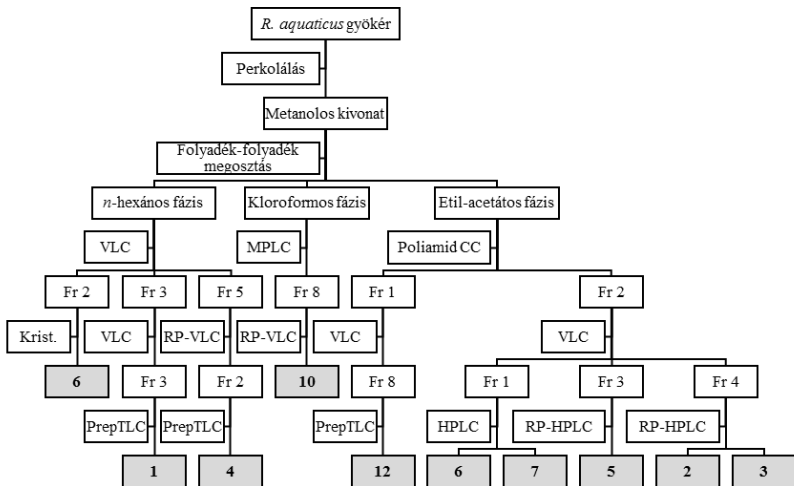
A Polygonaceae fajok szűrővizsgálata során meghatároztuk a kivonatok XO-gátló potenciálját is, amelynek során az extraktumokat 400 µg/ml koncentrációban teszteltük. 43 Kivonat mutatott 50%-ot meghaladó gátlást, amelyek közül 13 extraktum esetén a gátlás 80%-nál is magasabb volt. Ezeknél a kivonatoknál meghatároztuk az IC₅₀ értékeket is. A különböző polaritású frakciók közül általában a B (amely kloroformban oldódó, jellemzően lipofil karakterű vegyületeket tartalmaz) és a C (vizes-metanolos, hidrofíl vegyületek) mutatott aktivitást. Az *n*-hexános (A) és a maradék vizes (D) kivonatok közül csak a *R. crispus* föld feletti része esetén tapasztaltunk kifejezett gátló hatást. A vizsgálat során pozitív kontrollként a gyógyászatban használatos allopurinolt alkalmaztunk, amelynek általunk meghatározott IC₅₀ értéke 7,49 ± 0,29 µM volt.

A mért aktivitások alátámasztják a népi gyógyászatban leírt felhasználásokat. Tradicionálisan a sóskafeleket köszvényes, gyulladásos megbetegedések és krónikus szívelégtelenség kezelésére alkalmazzák. Vizsgálatunk során a *R. acetosella* esetén a (B) (IC₅₀ = 19,3 µg/ml), a *R. alpinus* virágából és terméséből nyert (B) (IC₅₀ = 23,4 µg/ml), a *R. conglomeratus* föld feletti részének kloroformos (B) (IC₅₀ = 23,4 µg/ml), a *R. hydrolapathum* gyökerének (C) (IC₅₀ = 25,4 µg/ml), a *R. patientia* virágának (B) és (C) (IC₅₀ = 27,6 és 18,9 µg/ml) és a *R. stenophyllus* virágának és termésének (C) kivonata (IC₅₀ = 27,4 µg/ml) mutatott magas XO-gátló aktivitást.

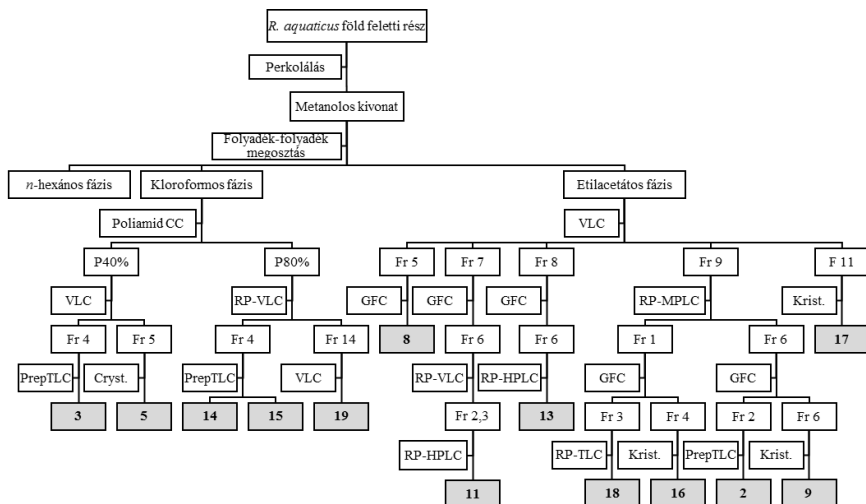
Korábbi vizsgálatok igazolták például a magas aktivitást mutató *R. acetosella* fenolos komponenseinek antioxidáns hatását, a XO-gátló hatásért felelős vegyületeket azonban nem vizsgálták. Ez a tulajdonság szorosan összekapcsolódik az antioxidáns kapacitással, mivel az enzimmediált xantin-húgysav átalakulás során is reaktív oxigéngyökök képződnek. Ezek alapján a növények szabadgyökfogó- és a redukálóképessége XO-gátló hatást is prediktálhat.

***R. aquaticus*ből és *R. thyrsoiflorus*ből izolált vegyületek**

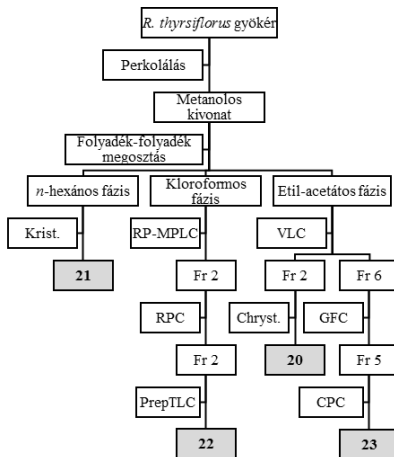
A *R. aquaticus* föld feletti részének és gyökerének valamint a *R. thyrsoiflorus* gyökerének feldolgozása során először metanolos kivonást végeztünk, amelyet betöményítést követően folyadék–folyadék megosztással, növekvő polaritású oldószerekkel (*n*-hexán, kloroform, etil-acetát) frakcionáltunk. Ez követően klasszikus és műszeres kromatográfias technikák kombinált alkalmazásával a két növényből 23 vegyületet izoláltunk (1-3. ábra).



1. ábra A *R. aquaticus* gyökér vegyületeinek izolálása



2. ábra A *R. aquaticus* föld feletti rész vegyületeinek izolálása

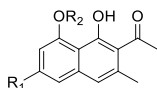


3. ábra A *R. thyrsoiflorus* vegyületeinek izolálása

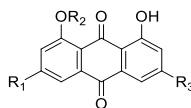
A vegyületek szerkezetét tömeg- és NMR spektroszkópai ($^1\text{H-NMR}$, JMOD, ^1H , $^1\text{H-COSY}$, HSQC, HMBC és NOESY) módszerek segítségével és irodalmi adatokkal történő összevetéssel határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy a vegyületek közül három

naftalinszármazék [musizin (**1**), musizin-8-*O*-glükózid (**2**), torakrizon-8-*O*-glükózid (**3**)], egy naftokinont [2-metoxistipandron (**4**)]; hat antrakinon [emodin (**5**), krizofanol (**6**), fiszcion (**7**), citreorozein (**8**), emodin-8-*O*-glükózid (**9**), krizofanol 8-*O*-glükózid (**10**)]. kettő stilbénzsármazék [rezveratrol (**11**) és piceid (**12**)]. hét flavonoidszármazék [kvercetin (**13**), kvercetin-3,3'-dimetiléter (**14**), izokempferid (**15**), kvercetin 3-*O*-arabinozid (**16**), kvercetin 3-*O*-galaktozid (**17**), katechin (**18**) és epikatechin (**22**)]. egy procianidin [procianidin B5 (**23**)]. kettő monoacil-glicerin [1-sztearoilglicerin (**19**) és 1-palmitoilglicerin (**20**)] és a **21** jelzésű pedig a β -szitoszerol (**4. ábra**).

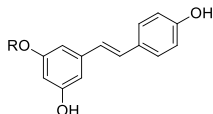
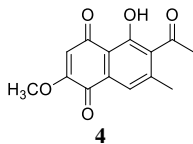
A *R. thyriflorus*ból először mutattuk ki ezeket a vegyületeket, valamint a musizin-8-*O*-glükózid (**2**) kivételével valamennyi vegyületet elsőként izoláltuk a *R. aquaticus*ból.



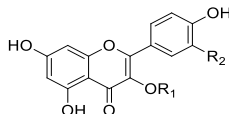
Vegyület	R ₁	R ₂
1	H	H
2	H	glü
3	OCH ₃	glü



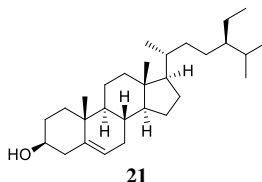
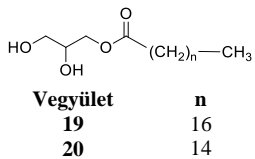
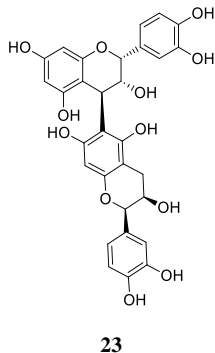
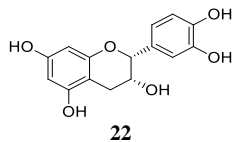
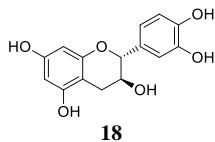
Vegyület	R ₁	R ₂	R ₃
5	OH	H	CH ₃
6	H	H	CH ₃
7	OCH ₃	H	CH ₃
8	OH	H	CH ₂ OH
9	OH	glü	CH ₃
10	H	glü	CH ₃



Vegyület	R
11	H
12	glü



Vegyület	R ₁	R ₂
13	H	OH
14	CH ₃	OCH ₃
15	CH ₃	H
16	ara	OH
17	gal	OH



4. ábra A *R. aquaticus*ból és a *R. thyriflorus*ból izolált vegyületek

Az izolált vegyületek antibakteriális hatása

A vizsgált növények *n*-hexános (A), kloroformos (B) és etil-acetátos (C) frakciója és folyadékkromatográfiás módszerekkel nyert alfrakcióik antibakteriális aktivitást mutattak több baktérium törzs esetén is. Az aktív frakciókból preparatív TLC, VLC és HPLC módszerekkel izoláltuk a hatásért feltehetően felelős vegyületeket, amelyek közül a musizin (**1**), és glükozidja (**2**) valamint a 2-metoxistipandron (**4**) bizonyult antibakteriális hatásúnak (**1. táblázat**).

1. táblázat Az izolált vegyületek (**1, 2** és **4**) antibakteriális hatása

Vegyület	Antibakteriális aktivitás - MIC (µg/ml)				
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>B. subtilis</i>	<i>M. catarrhalis</i>
1	50	50	100	50	12.5
2	-	-	-	200	-
4	50	25	50	25	12.5

Az izolált vegyületek XO gátló hatása

Teszteltük a *R. aquaticus*ból izolált vegyületek XO-gátló hatását is. Az irodalommal összhangban, legfőképpen a flavonoid-származékok mutattak aktivitást, a leghatásosabb vegyület a kvercetin (**13**) volt, melyet a kvercetin-3,3'-dimetiléter (**14**) és az izokempferid (**15**) követett. A kvercetin-glikozidok (**16** és **17**) és a katechin (**18**) nem mutatott XO-gátló aktivitást. Az antranooidok többsége inaktív volt, kivéve a citreorozein (**8**), amely esetén kiemelkedő gátló-hatást tapasztaltunk (**2. táblázat**).

Korábban már leírtak a szakirodalomban hatás-szerkezet összefüggéseket a flavonoidok XO-gátló potenciáljával kapcsolatban, amely szerint a flavánonok, a dihidroflavonolok és a flavánolok nem képesek gátolni az enzimet; a C-5 és C-7 helyzetű hidroxilcsoportok és a C-2 és C-3 közötti kettős kötés azonban fontos szerepet játszik a hatásban. A flavonoid-glikozidok esetén a vegyületek hidrofil jellege és a szterikus gátlás is az XO enzim iránti affinitáscsökkenést okozza.

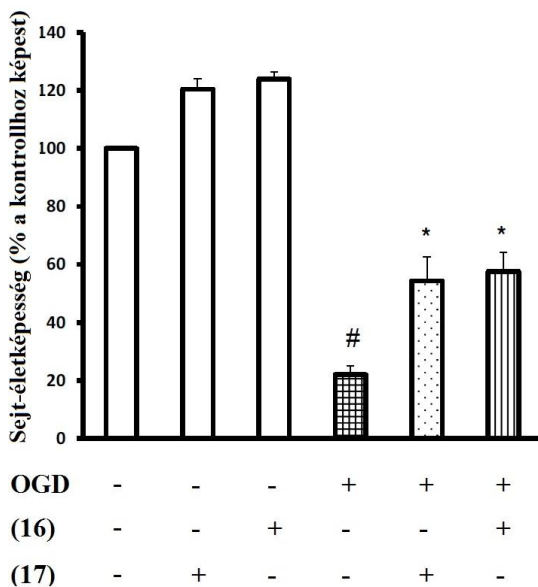
2. táblázat Az izolált vegyületek XO-gátló hatása*

Vegyület	XO gátlás	
	20 µg/ml (%± SD)	IC ₅₀ (µM ± SD)
1	15,41 ± 6,17	
2	28,39 ± 1,83	
3	25,26 ± 2,37	
5	10,53 ± 1,21	
8	83,52 ± 2,90	7,88 ± 0,77
11	27,62 ± 5,25	
13	94,19 ± 1,34	0,85 ± 0,03
14	48,72 ± 1,68	
15	43,37 ± 2,90	
allopurinol		7,49 ± 0,29

* A táblázatban csak az aktivitást (> 10% gátlás) mutató vegyületeket tüntettük fel.

***R. aquaticus*ből izolált flavonoid-glikozidok neuroprotektív hatásának vizsgálata**

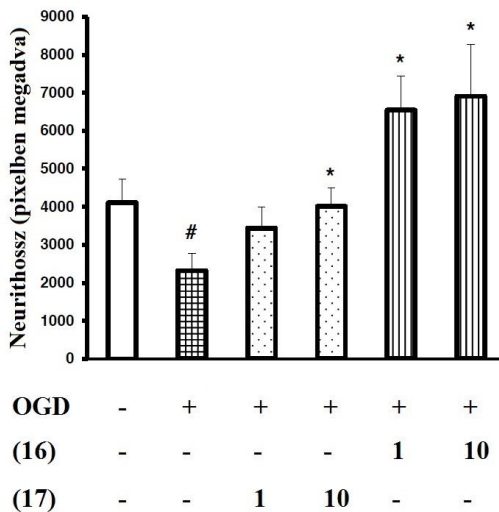
A *R. aquaticus* föld feletti részéből két flavonoid-glikozidot (**16** és **17**) izoláltunk és vizsgáltuk neuroprotektív hatásukat PC12 sejtvonalon OGD mediált sejthalál modellen. A kontroll sejtek életképessége OGD körülmények között 20%-ra csökkent. Mindkét vegyület már alacsony dózisban is 100%-os életképesség-növekedést idézett elő a flavonoidokkal nem kezelt sejtekhez képest (**5. ábra**).



5. ábra A flavonoid-glikozidok (**16** és **17**) neuroprotektív hatása PC12 sejtvonalon, OGD sejthalál modellen vizsgálva. A kontroll sejtek életképessége 20%-ra csökkent (# a kezeletlen sejtekhez képest) OGD körülmények között. A vegyületek már alacsony dózisban is 100%-os életképesség-növekedést idéztek elő a flavonoidokkal nem kezelt, OGD körülményeknek kitett sejtekhez képest (*), $P < 0.05$, $n=3$

Ahhoz, hogy egy vegyületet valóban neuroprotektívnek tekinthessünk, nem elég, hogy megőrzi a neuronok életképességét, elő kell segítenie a neuronhálózat újraépülését is a túlélő érett- és éretlen neuronsejtek aktiválásán keresztül a szinaptikus kapcsolatok újraformálásával, a neurogenesis és a neuritek növekedésének serkentésével. Így az ígéretesnek tűnő neuroprotektív hatást következő lépésként neurit-növekedési assay

segítségével vizsgáltuk, amelynek során az agyi ischaemiát, valamint az utána következő reperfúziót modelleztük és a vegyületek neuroresztoratív (ideghelyreállító) potenciálját határoztuk meg. A vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy az OGD-nek kitett kontroll sejtek neurithossza nagymértékben csökkent; a **17** jelzésű vegyület 10 μM -os dózisa esetén a folyamat teljesen megfordult, az **16** vegyület (1 μM és 10 μM) alkalmazása során pedig jelentős neurit-nyúlvány növekedést tapasztaltunk (**6. ábra**). A szinaptofizin a legfontosabb preszinaptikus vezikulaprotein, amely egyúttal a szinaptogenezis és a neurális funkcionális újjáépülés vizsgálatának gyakran alkalmazott markere. Vizsgálatunk során a kezeletlen kontroll sejtek OGD körülmények között drasztikus szinaptofizin szint csökkenést mutattak. A **17** anyag jelenlétében megnövekedett a protein szintje, érdekes azonban, hogy a **16** anyag nem okozott szignifikáns változást a szinaptofizin expresszióban, annak ellenére, hogy mindkét vegyület jelentős neuroprotektív hatást mutatott.



6. ábra A vegyületek neuro-resztoratív (ideghelyreállító) potenciáljának meghatározása. A neurit-növekedési assay során az agyi ischaemiát, valamint az utána történő reperfúziót modelleztük. Az OGD-kezelt kontroll sejtek neurithossza nagymértékben csökkent (#: a kezeletlen sejtekhez képest), a **17** (10 μM -os dózisa) esetén a folyamat teljesen megfordult, a **16** (1 μM és 10 μM) alkalmazása során pedig jelentős neurit-nyúlvány növekedést tapasztaltunk (*: az OGD-kezelt sejtekhez képest). P < 0.05

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a *Rumex* fajok másodlagos anyagcseretermékei gyógyszerfejlesztések új modellanyagaiként szolgálhatnak, figyelembe véve jelentős farmakológia potenciáljukat és különösen a kiemelkedő xantioxidáz-gátló és neuroprotektív aktivitásukat.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet és nagyrabecsülésemet fejezem ki témavezetőimnek, *Prof. Dr. Hohmann Judit*nak (a Farmakognóziai Intézet vezetőjének) és *Dr. Vasas Andreának* munkám folyamatos irányításáért, szakmai tanácsaikért, az Intézetben eltöltött idő folyamán irányomban tanúsított emberségükért, kifogyhatatlan optimizmusukért és az értekezés megírásában nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom az Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Karának és a University of Toledo College of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences-nek, hogy részt vehettem a testvéregyetemek közötti cserediák-programban.

Őszinte köszönetem fejezem ki *Dr. Ana Martins*nak, *Dr. Lektor-Busa Erikának*, *Dr. Aparna Raghavan*-nak és *Dr. Zahoor A. Shah*-nak a farmakológiai vizsgálatok során nyújtott segítségükért.

Hálás vagyok *Dr. Jakab Gusztávnak* a növények begyűjtéséért és azonosításáért; *Dr. Kúsz Norbertnek*, *Dr. Dankó Balázsnak*, *Dr. Forgó Péternek* és *Dr. Jedlinszki Nikolettának* az NMR és MS mérésekért.

Köszönöm a Farmakognóziai Intézet valamennyi munkatársának a munkámhoz nyújtott segítségét. Külön köszönet illeti kollégáimat, *Dr. Rédei Dórá*t, *Dr. Veres Katalint*, *Dr. Ványolós Attilát*, *Dr. Csupor Dezsőt* és *Dr. Lajter Ildikót* akik mindig készek voltak tanácsaikkal, támogatásukkal munkámat segíteni. Köszönöm tudományos diákkörös hallgatómnak, *Dr. Stefkó Dórá*nak a munkáját és barátságát.

Szeretném megköszönni barátaimnak, *Kiss Tivadarnak*, *Dr. Zomborszki Zoltán Péternek*, *Dr. Tóth Barbarának*, *Horváth-Boros Klárának* és *Horváth Attilának* támogatásukat és tanácsaikat. Segítségük nélkül a disszertációm nem születhetett volna meg.

Köszönettel tartozom férjemnek az évek során nyújtott szeretetéért, támogatásáért és megértéséért. Végül köszönöm családomnak a szerető támogatást és gondoskodást, amely mindig biztos háttérül szolgált a munka elvégzése során.

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 támogatta.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:

1. **Orbán-Gyapai O**, Raghavan A, Vasas A, Forgo P, Hohmann J, Shah Z A
Flavonoids isolated from *Rumex aquaticus* exhibit neuroprotective and neurorestorative properties by enhancing neurite outgrowth and synaptophysin.
CNS and Neurological Disorders. Drug Targets 2014, 13:(8) 1458–1564
If: 2,628
2. **Orbán-Gyapai O**, Lajter I, Hohmann J, Jakab G, Vasas A
Xanthine oxidase inhibitory activity of extracts prepared from Polygonaceae species.
Phytotherapy Research 2015, 29: 459–465
If: 2,694
3. Vasas A, **Orbán-Gyapai O**, Hohmann J
The Genus *Rumex*: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology.
Journal of Ethnopharmacology 2015, 175: 198–228
If: 3,055
4. **Orbán-Gyapai O**, Liktör-Busa E, Kúsz N, Stefkó D, Urbán E, Hohmann J, Vasas A
Antibacterial screening of *Rumex* species native to the Carpathian Basin and bioactivity-guided isolation of compounds from *Rumex aquaticus*.
Fitoterapia 2017, 118: 101–106
If: 2,698*
5. **Orbán-Gyapai O**, Forgo P, Hohmann J, Vasas A
Phytochemical and pharmacological investigation of *Rumex thyrsiflorus* Fingerh.
Acta Biologica Hungarica 2017, 68: 232–236.
If: 0,506*
(*2016. évi számítás alapján)

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. Hajdú Zs, Martins A, **Orbán-Gyapai O**, Forgo P, Jedlinszki N, Máthé I, Hohmann J
Xanthine oxidase-inhibitory activity and antioxidant properties of the methanol extract and flavonoids of *Artemisia asiatica*
Records of Natural Products 2014, 8: 299–302.
If: 1,160
2. Ványolós A, **Orbán-Gyapai O**, Hohmann J
Xanthine oxidase inhibitory activity of Hungarian wild-growing mushrooms
Phytotherapy Research 2014, 28: 1204–1210.
If: 2,660
3. Gospodinova Z, Bózsity N, Ocsovszki I, **Orbán-Gyapai O**, Krasteva M, Zupkó I
Chloroformic fraction of *Tanacetum vulgare* L. induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF7 cells
International Journal of Pharma Sciences 2015, 5: 986–990.
If: -
4. Kírmizibekmez H, Tiftik K, Kúsz N, **Orbán-Gyapai O**, Zomborszki Z, Hohmann J
Three new iridoid glycosides from the aerial parts of *Asperula involucrata*
Chemistry & Biodiversity 2016, 14: Paper e1600288.
If: 1,440

5. Kovacs B, Zomborszki ZP, **Orban-Gyapai O**, Csupor-Loffler B, Liktör Busa E, Lazar A, Papp V, Urban E, Hohmann J, Vanyolos A
Investigation of antimicrobial, antioxidant, and xanthine oxidase-inhibitory activities of *Phellinus* (Agaricomycetes) mushroom species native to Central Europe
International Journal of Medicinal Mushrooms 2017, 19: 387–394.
If: 1,104
6. Tuzun BS, Hajdu Zs, **Orban-Gyapai O**, Zomborszki ZP, Jedlinszki N, Forgo P, Kivcak B, Hohmann J
Isolation of chemical constituents of *Centaurea virgata* Lam. and xanthine oxidase inhibitory activity of the plant extract and compounds
Medicinal Chemistry 2017, 13: 498–502.
If: 2,331

ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK:

1. **Orban-Gyapai O**, Raghavan A, Vasas A, Forgo P, Shah ZA, Hohmann J
Flavonoid-glycosides from *Rumex aquaticus* with neuroprotective activity
Planta Medica: Natural Products and Medicinal Plant Research 2014, 80: Paper P1L110.
62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research - GA 2014. Guimaraes, Portugália: 2014.08.31.-09.04.
2. **Orbán-Gyapai O**, Raghavan A, Vasas A, Forgo P, Shah ZA, Hohmann J
Neuroprotektív hatású flavonoidok izolálása a *Rumex aquaticus*ból
Gyógyszerészet 2014, 58:(Suppl. I.) p. 87.
Congressus Pharmaceuticus XV.. Budapest, Magyarország: 2014.04.10 12.
3. **Orbán-Gyapai O**, Raghavan A, Vasas A, Forgo P, Shah ZA, Hohmann J
Neuroprotektív hatású vegyületek izolálása a *Rumex aquaticus*ból
Fiatal Gyógynövénykutatók Fóruma: A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Gyógynövény Szakosztályának tudományos konferenciája. Budakalász , Magyarország , 2014.02.14.
4. **Orbán-Gyapai O**, Liktör-Busa E, Urbán E, Kúsz N, Jakab G, Stefkó D, Hohmann J, Vasas A
Antibacterial activity of *Rumex aquaticus* and *R. thyrsoiflorus* extracts and isolation of the biologically active compounds
Planta Medica: Natural Products and Medicinal Plant Research 2015, 81:(16) Paper PM_12.
63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA2015). Budapest, Magyarország: 2015.08.23-27.