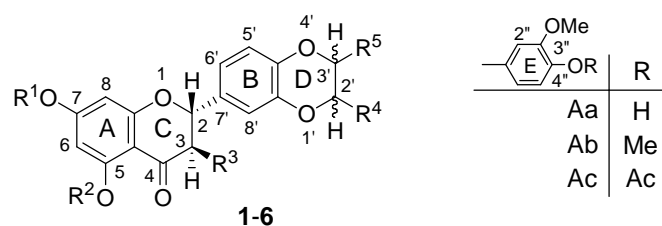


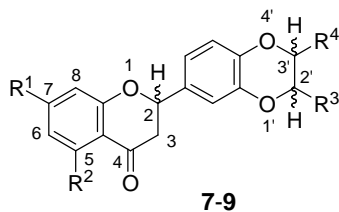
A lila virágú Máriatövis extraktumában található silybinről (**1a,b**) korábban kimutattuk, hogy gátolja a humán neutrofilek szuperoxid anion termelését ( $O_2^-$ ), az oxidációs robbanás beindításáért felelős protein kináz C (PKC) és NADPH oxidáz aktivitását, valamint a xantin oxidáz aktivitását. A silybin lipid oldékonyságának megváltoztatásával az előbbieken felsorolt paraméterek mindegyike befolyásolható volt, a lipid oldékonyság (**5a,b**) növelése fokozta a silybin antioxidáns hatását humán neutrofilekben, ami annak tulajdonítható, hogy a lipid oldékonyság növelése segíti a molekula átjutását a sejtmembránon. Kimutattuk továbbá, hogy a silybin 3-metoxi-4-hidroxifenil csoportjának eltávolítása nem befolyásolta a silybin antioxidáns hatását a PMA-stimulálta neutrofilek  $O_2^-$  termelésének gátlásában. Igazoltuk, hogy a flavon gyűrűt tartalmazó molekula antioxidáns hatása minden rendszerben meghaladta az azonos szerkezetű flavanon molekulák hatását. Minden esetben a  $O_2^-$  termelés gátlása a PKC aktivitásának és sejtmembránba történő transzlokációjának gátlására vezethető vissza. (Varga Z, Czompa A, Újhelyi L, Kiss A, Balla J, Antus S. Effect of silybin on phorbol myristate acetate-induced protein kinase C translocation, NADPH oxidase activity, and apoptosis in human neutrophils. *Phytomedicine* 2004, 11:206-212 és Varga Z, Seres I, Nagy E, Ujhelyi L, Balla G, Balla J, Antus S. Structures prerequisite for antioxidant activity of silybin in different biochemical systems in vitro *Phytomedicine* 2006. 13: 85-93.)

1. ábra. A silybin (1,a,b) és különböző lipidoldékonyságú származékának (5a,b; 6a,b) az isosilybinnek (2a,b) és a fehér virágú Máriatövis extraktumában izolált molekuláknak (3 és 4) a szerkezete.

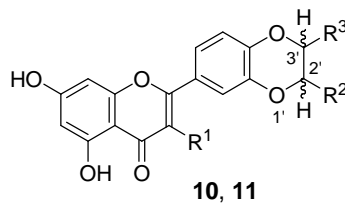


	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	Configuration at	
						C-2'	C-3'
(+)-silybin ( <b>1a</b> )	H	H	OH	Aa	CH <sub>2</sub> OH	R	R
( <b>1b</b> )	H	H	OH	Aa	CH <sub>2</sub> OH	S	S
(+)-isosilybin ( <b>2a</b> )	H	H	OH	CH <sub>2</sub> OH	Aa	R	R
( <b>2b</b> )	H	H	OH	CH <sub>2</sub> OH	Aa	S	S
(-)-isosilandrin ( <b>3</b> )	H	H	H	Aa	CH <sub>2</sub> OH	R	R
(-)-silandrin ( <b>4</b> )	H	H	H	CH <sub>2</sub> OH	Aa	R	R
(+)-5,7,4"-trimethylsilybin ( <b>5a</b> )	Me	Me	OH	Ab	CH <sub>2</sub> OH	R	R
( <b>5b</b> )	Me	Me	OH	Ab	CH <sub>2</sub> OH	S	S
(+)-peracetylsilybin ( <b>6a</b> )	Ac	Ac	OAc	Ac	CH <sub>2</sub> OAc	R	R
( <b>6b</b> )	Ac	Ac	OAc	Ac	CH <sub>2</sub> OAc	S	S

2. ábra. A silybin és isosilybin származékok szerkezete.



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Configuration at		
					C-2	C-2'	C-3'
<i>rac-7</i>	OH	OH	H	CH <sub>2</sub> OH	<i>R/S</i>	-	<i>R/S</i>
(-)- <b>7</b>	OH	OH	H	CH <sub>2</sub> OH	<i>R/S</i>	-	<i>S</i>
<i>rac-8</i>	OH	OH	CH <sub>2</sub> OH	H	<i>R/S</i>	<i>R/S</i>	-
(-)- <b>8</b>	OH	OH	CH <sub>2</sub> OH	H	<i>R/S</i>	<i>S</i>	-
<i>rac-9</i>	H	H	H	H	-	-	-



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Configuration at	
				C-2'	C-3'
<i>rac-10</i>	H	H	CH <sub>2</sub> OH	<i>R/S</i>	-
<i>rac-11</i>	H	CH <sub>2</sub> OH	H	-	<i>R/S</i>
<i>rac-12</i>	OH	Aa	CH <sub>2</sub> OH	<i>R/S</i>	<i>R/S</i>
<i>rac-13</i>	OH	CH <sub>2</sub> OH	Ac	<i>R/S</i>	<i>R/S</i>

Az elmúlt években olyan közlemények jelentek meg, amelyekben arról számoltak be, hogy a lila virágú Máriatövisben a silybin mellett megtalálható szerkezeti analóg, az isosilybin (**2a,b**), hatásosabb antioxidáns, mint a silybin. Az irodalmi megfigyelések alapján, az előző években előállított silybin származékokhoz hasonlóan, az azokkal megegyező, isosilybin szerkezetű molekulákat is megszintetizáltuk. Az egyes szerkezeti analógok esetében a racémátok mellett, az optikailag aktív vegyületeket is előállítottuk (a szerkezeteket a 2. ábrán mutatjuk be). A molekulák szerkezet-hatás összefüggés (SAR) vizsgálata során a következő eredményeket kaptuk

1. A neutrofilek O<sub>2</sub><sup>-</sup> termelésére kifejtett hatás vizsgálata során megállapítottuk, hogy mind a silybin, mind az isosilybin sorozatba tartozó vegyületek közül a flavon analógok (*rac-10* és *rac-11*), valamint a silybin váz (*rac-9*) gátolta leghatásosabban a neutrofilek PMA-stimulálta O<sub>2</sub><sup>-</sup> termelését. Kimutattuk továbbá, hogy a D ringben a C2' és C3' királis centrumok abszolút konfigurációja szignifikánsan befolyásolja a vegyületek O<sub>2</sub><sup>-</sup> termelést gátló hatását, és mind a silybin és isosilybin szerkezetnél a tiszta diasztereomer hatásosabb volt, mint a racémát keverék [(-)-**7** > *rac-7* and (-)-**8** > *rac-8*]. Igazoltuk továbbá, hogy függetlenül attól, hogy a vegyületek képesek-e gátolni a NADPH oxidáz aktivitását,

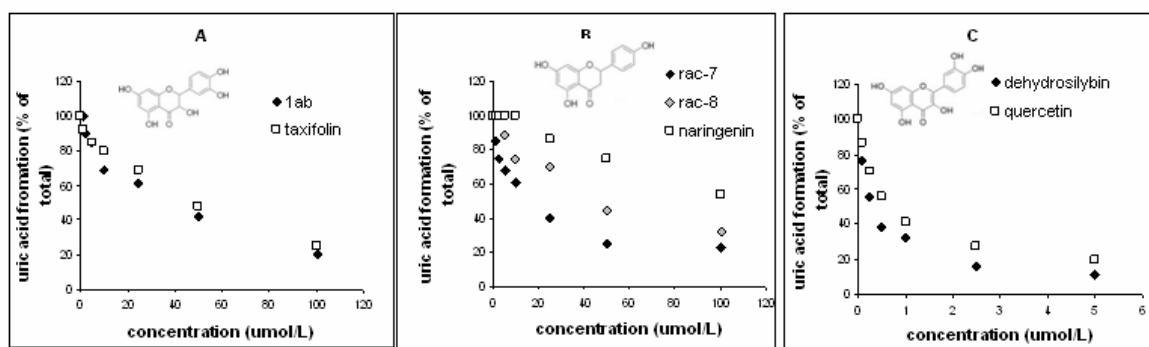
a PMA jelátviteli útjában első lépésként aktiválódó PKC gátlása a végső hatás szempontjából a meghatározó (Kosaras E, Katko M, Balla J, Paragh G, Antus S, Varga Z. Regulation of Oxidative Burst in Neutrophils by Silybin and Its Derivatives After Phorbol-ester Stimulation. Invited paper "Recent Progress in Medicinal Plants" 21 volume invited paper (in press).

2. Xantin oxidáz aktivitás gátlása szempontjából a silybin és isosilybin származékok közül ugyancsak a flavon származékok bizonyultak a leghatásosabbaknak (*rac.*-**10**, *rac.*-**11**). Igazoltuk azt is, hogy a C5 és C7 dihidroxici-csoportok jelenléte az A gyűrűben esszenciális, hiányában a molekulák elvesztették gátló hatásukat (pl. flavon váz; *rac.*-**9**, amely gyakorlatilag nem befolyásolja a xantin oxidáz aktivitását). Igazoltuk, hogy a xantin oxidáz aktivitásának gátlása szempontjából -a neutrofilel szuperoxid anion termeléséhez hasonlóan- a C2' és C3' királis centrumok abszolút konfigurációjának szerepe van, és mind a silybin és isosilybin szerkezetnél a tiszta diasztereomer hatásosabb volt, mint a racemát keverék [*(-)*-**7** > *rac.*-**7** and *(-)*-**8** > *rac.*-**8**]. Továbbá, a xantin oxidáz aktivitását minden molekula típusnál a silybin származék hatásosabban gátolta, mint az azonos szerkezetű isosilybin származék (Kosaras E, Katko M, Cseke B, Paragh G, Nagy EV, Ferenczi R, Antus S, Varga Z. New insight into the inhibition of xanthine oxidase activity by silybin and its structural analogues: structure activity relationship. beküldve Phytother Res, 2007).
3. Direkt gyökfogó tulajdonsággal csak a silybin (**1a,b**), valamint a silybin (*rac.*-**10**) és isosilybin (*rac.*-**11**) flavon származéka rendelkezett (DPPH és OH-gyök).
4. Igazoltuk, hogy az összes szintetizált molekula és maga a silybin vas(3+)-kötő képességgel rendelkezik, és a flavon származékok ezen túlmenően vas(3+)-redukáló hatással is rendelkeznek (Katkó M, Kosaras E, Antus S, Varga Zs. A silybin analógok lipofil gyökfogó, vas(2+)-kötő és vas(3+) redukáló képessége Magyar Szabadgyök-kutató Társaság Munkaértekezlete 2006. szept. 11. Budapest. Varga Z, Nagy E, Katko M, Jeney V, Seres I, Paragh G, Balla J, Antus S: Relationship of structure and antioxidant activity of synthetic silybin-derived molecules: identification of molecular structure responsible for antioxidant activity employing various models for inducing oxidative stress. Editor.H.V. Panglossi. Invited paper „New Developments in Antioxidant Research” Nova Science Publishers Inc. Chapter 6. pp.113-151. 2006.)

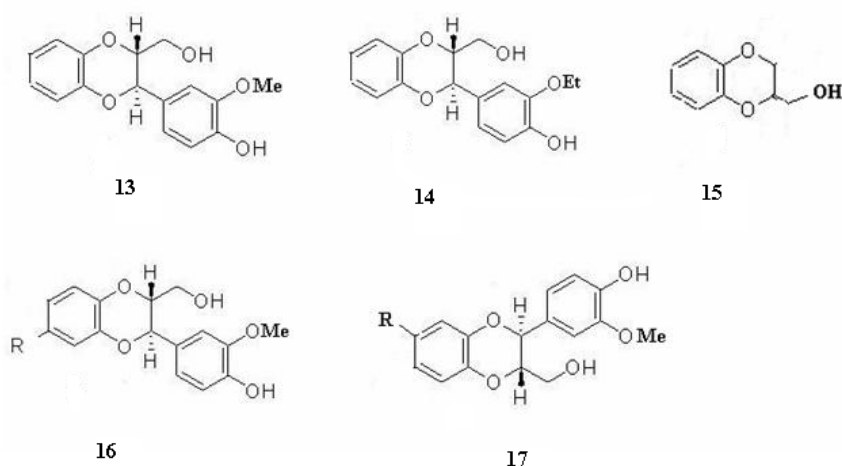
További vizsgálatainkban, a hazánkban honos fehér virágú Máriatövis extraktumában korábban munkacsoportunk által azonosított flavanoidok antioxidáns hatását kezdtük részletesen vizsgálni. A fehérvirágú Máriatövisben azonosított flavanolignánok a (-)-isosilandrin (**3**) és (-)-silandrin (**4**) voltak. Igazoltuk, hogy ezek a flavanolignánok nagyobb mértékben gátolják a neutrofilek PMA-stimulálta O<sub>2</sub><sup>-</sup> termelését, mint a silybin (70 % vs. 28%). Az első eredmények továbbá azt mutatják, hogy a (-)-isosilandrin (**3**) és (-)-silandrin (**4**) gyökfogó képessége a silybinhez hasonló (Samu Z, Nyíredi S, Baitz-Gács E, Varga Z, Kurtán T, Dinya Z, Antus S. Structure elucidation and antioxidant activity of (-)-isosilandrin isolated from *Silybum marianum* L. Chem Biodiversity 2004. 1:1668-1677.)

Összevetettük a silybin (**1a,b**) és szerkezeti analógjainak (**7-12**) xantin oxidáz aktivitásra kifejtett hatását olyan flavonoidokéval, melyekben az A és C gyűrű szerkezete megegyezik az általunk szintetizált molekulákéval. A korábbi vizsgálati eredmények ugyanis azt mutatták, hogy a flavonoidok esetében azok képesek a xantin oxidáz aktivitását hatásosan befolyásolni, amelyekben C5' C7' dihidroxil csoportok mellett, a 3'4' dihidroxil csoportok jelenléte is szükséges; ezek a helyek a flavanolignánokban az 1,4-benzodioxán gyűrűnek tulajdoníthatóan, foglaltak. Az eredményeket a 3. ábrán mutatjuk be. Látható, hogy a flavanolignánok minden esetben hatásosabban gátolták a xantin oxidáz aktivitását, mint az A és C gyűrűben hasonló szerkezettel rendelkező flavonoidok. Ennek alapján felmerült az a lehetőség, hogy a flavanolignánokban a D gyűrűhöz kapcsolódó 1,4-benzodioxán résznek szerepe van a molekula antioxidáns hatásának kialakításának.

3. ábra. A silybin, silybin származékok hatása a xantin oxidáz aktivitásra az A és B gyűrű szerkezetében azonos flavonoidok hatásával összehasolítva (silybin vs.taxifolin, flavanon származékok (7, 8) vs.naringenin és dehydrosilybin vs. quercetin).



5. ábra. A silybin 1,4-benzodioxán része (**13**) és az előállított származékok szerkezete (**14-17**) (R:-CH=CH-CO<sub>2</sub>Et).



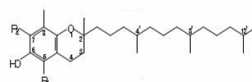
Így megszintetizáltuk (a szerkezeteket az 5. ábrán mutatjuk be) az 1,4-benzodioxán részt (**13**), ennek etilált változatát (**14**), az alapvázat (**15**) és kettőskötésű oldalláncot tartalmazó származékot (**16, 17**). Antioxidáns hatás vizsgálata során megállapítottuk, hogy az 1,4-

benzodioxán rész (**13**) hatásosabban gátolja a neutrofilek PMA-stimulálta  $O_2^-$  termelését, mint a silybin (78% vs. 28 %), és a kettőskötést tartalmazó oldallánc beépítése (**16, 17**) csak kismértékű hatás-növekedést eredményezett. A Me-Et csoport csere (**14**) az antioxidáns hatás csökkenését eredményezte, míg az alapváz (**15**) ugyancsak hatásos antioxidánsnak bizonyult ebben a rendszerben. Az előző molekulák esetében talált megállapításhoz hasonlóan, a neutrofilek oxidációs robbanásának gátlásában az 1,4-benzodioxán rész estében is a PKC aktivitásának és transzlokációjára kifejtett gátló hatás a meghatározó. A xantin oxidáz aktivitását az 1,4-benzodioxán rész (**13**), a metilált változata (**14**) és az alapváz (**15**) kevésbé volt képes az enzime gátlására, mint a silybin (**1a,b**), míg a kettőskötést tartalmazó oldallánc beépítése (**16, 17**) a gátló képességet jelentős mértékben fokozta ( $IC_{50}$  7  $\mu$ mol vs. 32  $\mu$ mol). A gyök-stabilizáló képességet vizsgálva megállapítottuk, hogy az etilált 1,4-benzodioxán származék (**14**) hatása megegyezett, a metilált (**13**) kb. kétszer hatásosabb, míg az oldalláncot tartalmazó vegyületek (**16, 17**) gyökstabilizáló képessége jelentős mértékben meghaladta a silybin gyök-stabilizáló képességét. Az alapváz azonban (**15**) gyökstabilizáló hatással nem rendelkezett. Az eredmények egyértelműen mutatják, hogy a silybinben található 1,4-benzodioxán rész önmagában is hatásos antioxidáns tulajdonságokkal rendelkezik (Katko M, Kosaras E, Nagy E, Komodi E, Balla J, Paragh G, Ferenczi R, Antus S, Varga Z. Antioxidant activity of silybin: Its 1,4-Benzodioxane moiety inhibits more effectively superoxide anion production in neutrophils and possesses higher radical scavenging activity as silybin itself. kézirat beküldés előtt Biochem Pharmacol). Ennek a megállapításnak egyik fontossága, hogy ezek a molekulák viszonylag egyszerű szintézissel előállíthatók.

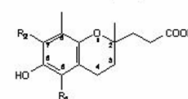
Vizsgálainkat kiterjesztettük a tokoferolok és vízoldható metabolitjaik antioxidáns hatásának tanulmányozására is (a molekulák szerkezete a 6. ábrán látható).

6. ábra. Tokoferolok és vízoldható metabolitjaik szerkezete.

tocopherols



CECH metabolites



R1	R2	homologue
CH3	CH3	$\alpha$
CH3	H	$\beta$
H	CH3	$\gamma$
H	H	$\delta$

1. Megállapítottuk, hogy a tokoferol vízoldható metabolitjai, hasonlóan, a silybin 1,4-benzodioxán származékaihoz, kisebb koncentrációkban, nagyobb hatékonysággal gátolták a neutrofilek PMA-stimulálta  $O_2^-$  termelését, mint maguk a tokoferolok vagy a silybin. Ez mindkét családban a PKC aktivitás gátlására kifejtett hatásnak tulajdonítható. A tokoferolok és vízoldható metabolitjaik közül a gamma homológ bizonyult a leghatásosabbnak.

2. Jelentős különbséget találtunk azonban a két molekula-család xantin oxidáz aktivitására kifejtett hatásában; míg a silybin 1,4-benzodioxán származékai hatásosabban gátolták a xantin oxidáz aktivitását, mint a silybin (1,ab), addig a tokoferol metabolitok teljesen hatástalannak bizonyultak, és maguk a tokoferolok is gyenge hatással bírtak.
3. Direkt gyökfogó tulajdonságot tekintve a tokoferolok vízzoldható metabolitjai ugyanolyan hatásosak voltak, mint maguk a tokoferolok, míg az 1,4-benzodioxán származékok sokkal jelentősebb gyökstabilizáló képességgel rendelkeztek, mint a silybin (1,ab).

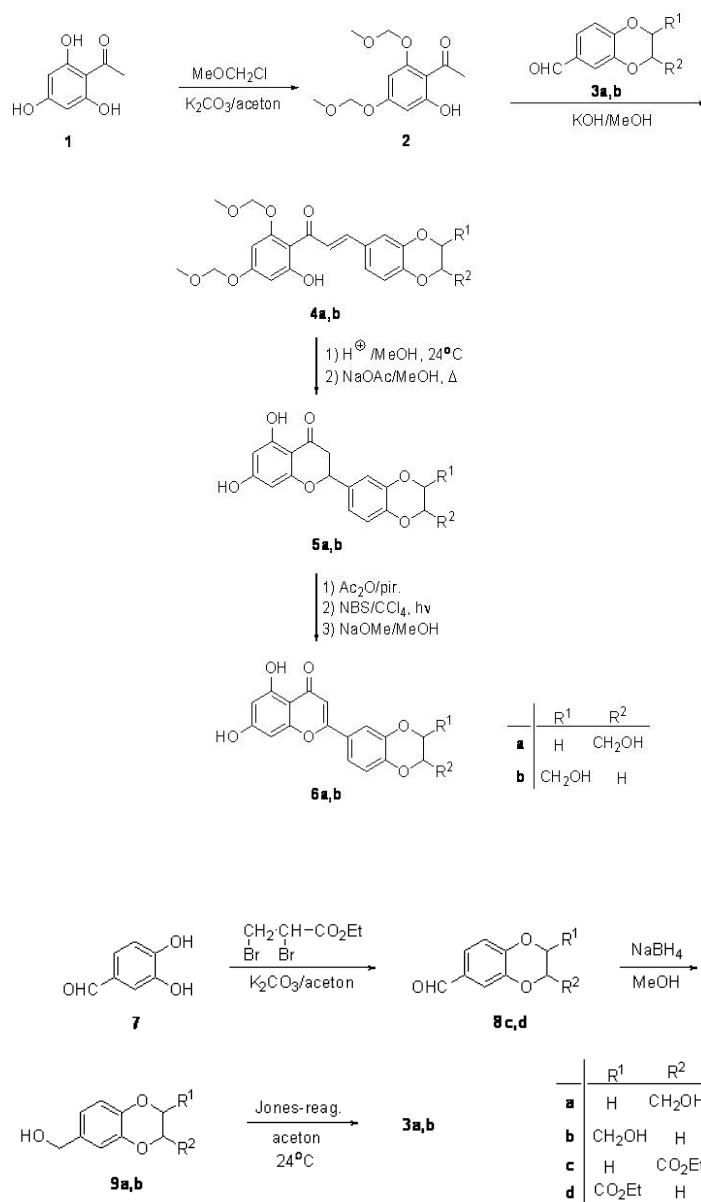
Összefoglalva ezen eredményeket, megállapíthatjuk, hogy a tokoferolok ( $\alpha$ -,  $\gamma$ - és  $\delta$ -tokoferol) és vízzoldható metabolitjaik egyaránt rendelkeznek antioxidáns hatással, így teljes mennyiségüket figyelembe kell venni a szervezet antioxidáns kapacitásának megítélése szempontjából. Továbbá igazoltuk, hogy a  $\gamma$ -tokoferol és metabolitjának antioxidáns hatása a vizsgált rendszerekben meghaladta az  $\alpha$ -tokoferol hatását (Varga Z, Kosaras E, Komodi E, Katko M, Karpati I, Paragh G, Balla J, Aisa MC, Galli F. Effects of tocopherols and 2,2'-carboxyethyl hydroxychromans on phorbol-ester stimulated neutrophils. *J Nutr Biochem.* 2007 Jul 31; [Epub ahead of print]).

Az előző vizsgálataink alapján egyértelműen megállapíthatjuk, hogy számos olyan vegyületet sikerült szintetikus úton előállítani (pl. flavon származékok, 1,4-benzodioxán származékok), melyek antioxidáns hatása jelentős mértékben meghaladja a silybinét. Igen figyelemre méltó, hogy ezek a vegyületek nemcsak a neutrofilek PMA-stimulálta  $O_2^-$  termelését, hanem a xantin oxidáz aktivitását is képesek gátolni. Ez utóbbi a következők miatt jelentős: az utóbbi évek klinikai vizsgálatai rámutattak arra, hogy a szérum húgysavszint-emelkedés, a myocardialis infarctus súlyosságával, a reinfarctus gyakoriságával szoros kapcsolatot mutat. Ennek alapján felmerül xantin-oxidáz-gátlók prevenció és terápiás alkalmazásának lehetősége. Jelenleg egyetlen szer van (allopurinol), amelyet a klinikumban ilyen célra alkalmaznak. Molekuláink közül a flavon származékok ( $IC_{50} < 0.02 \mu\text{mol}$ ) több nagyságrenddel hatékonyabbak, mint az allopurinol ( $IC_{50} \sim 3 \mu\text{mol}$ ), míg az 1,4 benzodioxán-származékok ( $IC_{50} \sim 7 \mu\text{mol}$ ) hasonló gátló hatással bírnak. Ennek alapján állatkísérletek elvégzését tervezzük, amelyben a koleszterin-dús táplálék kiváltotta xantin oxidáz aktivitás fokozódás kivédését kívánjuk in vivo tanulmányozni. Ehhez több gramm anyag megszintetizálása szükséges.

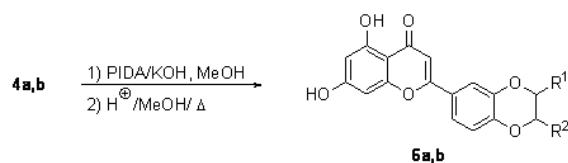
A flavon származékokat az 6. ábrán feltüntetett 7 lépéses szintézissel állítottuk elő. E szintézis 2. lépésében felhasznált aldehideket (**3a,b**) pedig protocatechualdehidből (7) kiindulva szerkezetbizonyító módon 4 lépéses szintézissel nyertük (Czompa A, Dinya Z, Antus S, Varga Z. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 333;175-80/2000). Minthogy ez a szintézis a megfelelő aldehidszármazékok előállítása során fellépő szelektivitási problémák miatt nem lépték növelhető, ezért a 3a,b aldehidek előállítását új úton kíséreltük meg. A protocatechualdehidet (7) először eltérően a korábbiaktól nem regioszelektíven monobenzileztük, hanem közvetlenül 1, 2-dibróm-akrilsav etilészterrel reagáltattuk és így 38%-os hozammal a 8c,d észterszármazékok keverékét (8c:8d=2:1) kaptuk meg. Minthogy ezek elválasztása mind frakcionált vákuumdesztillációval, mind oszlop-kromatográfiával sikertelen volt, ezért e keveréket közvetlenül nátriumborohidriddel etanolban a megfelelő

diolok (9a,b) keverékévé redukáltuk. E vegyületeket 65%-os nyereséggel oszlopkromatográfiás tisztítás után kaptuk meg.

6. ábra A silybin flavon származékának szintézise



7. ábra. A célvegyület előállítása az általunk kidolgozott un. rövidített szintézis úttal.



Megjegyzendő, hogy az izomer diolok (**9a,b**) rétegekromatográfiásan ugyan elválaszthatók voltak, de a csekély R<sub>f</sub> különbségük miatt ezek elválasztását már oszlopkromatográfiásan nem tudtuk megvalósítani. Az így nyert diolkeveréket sikertelen MnO<sub>2</sub>-os oxidáció után végül Jones-oxidációval közepes hozammal (32%) a megfelelő aldehidkeverékévé (**3a,b**) alakítottuk át. A következő lépésben az aldehidkeveréket 4,6-bisz(metoximetil)-floracetofenonnal (**2**) kondenzálva 86%-os termeléssel a kívánt kalcion keveréket (**4a+4b**) kaptuk meg, melyekből az általunk (Gy. Litkei, K. Gulácsi, S. Antus, G. Blaskó, Liebigs Ann.Chem.1995,1711-1715) korábban kidolgozott un. rövidített úton két lépésben (7.ábra) 27%-os nyeredéssel a célvegyületeket kaptuk meg. A tervezett farmakológiai vizsgálatokhoz így 1790 mg kristályos termék (**6a+6b**) van már a kezünkben. Az eddigi munkánk alapján az is megállapítható, hogy a célvegyületek nagyobb léptékű előállításához a fentiekől eltérő szintézis stratégiára van szükség. Klasszikus flavonoid-kémiai módszerekkel megvalósítottuk már az 5,7-dihidroxi-3',4'-dibenziloxiflavon előállítását és most a benzilvédő csoportok helyén a hidroximetil-1,4-benzodioxan gyűrűrendszer kiépítésén dolgozunk.

Reményeink szerint rövidesen elegendő vegyület áll rendelkezésre az állatkísérletek megkezdéséhez.

Összefoglalva eredményeinket igazoltuk, hogy a silybin flavon származékai és az izolált 1,4-benzodioxán rész, a legtöbb vizsgált rendszerben, hatásosabb antioxidáns, mint maga a silybin. Kimutattuk, hogy más szerkezeti elemek jelenléte szükséges pl. a gyökfogó képesség (intakt silybin és 1,4-benzodioxán rész), a szuperoxid anion termelés ill. PKC gátlás (alapváz, hidroxil csoportok nem szükségesek), vagy a xantin oxidáz gátlás (5,7 dihidroxi-csoportok és C2-C3 kettős kötés) szempontjából. Eredményeink alapján az oxidatív stressz kivédésére a forrástól függően hatásos antioxidánsok szintetizálhatók.

Végül, de nem utolsó sorban, az OTKA Bizottság támogatásával végzett kutatási eredményeink közzlése alapján, két nemzetközi könyvkiadó kért fel bennünket eredményeink közzlésére illetve összefoglaló írására, amely lehetőségért külön köszönetet mondunk.