

# MAGYARORSZÁGI *CENTAUREA* FAJOK

## BIOLÓGIAILAG AKTÍV VEGYÜLETEINEK VIZSGÁLATA

Szakmai beszámoló a PD 71724 OTKA pályázathoz

**Dr. Csupor Dezső egyetemi adjunktus**

Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszerésztudományi Kar  
Farmakognóziái Intézet

1

A *Centaurea sadleriana* Janka Magyarországon őshonos, kizárólag a Kárpát-medencében előforduló faj. Föld feletti részéből készített főzetét tradicionálisan alkalmazzák haszonállatok sebeinek gyógyítására a Dél-Alföldön. Ezt a népi gyógynövény-alkalmazást elsőként kutatócsoportunk írta le. Jelen munka célja a *C. sadleriana* fitokémiai és farmakológiai vizsgálata, valamint a rokon fajok tanulmányozása volt a hasonló célú felhasználás szempontjából. A pályázat munkatervében vállalt feladatokat az alábbiak szerint teljesítettem:

### 1. NÖVÉNYI MINTÁK BEGYŰJTÉSE

A *C. sadleriana* föld feletti részének mintáját részletes fitokémiai vizsgálat céljára begyűjtöttem.

Tizenkét, a Kárpát-medencében előforduló, honos, illetve termesztett *Centaurea* faj (*C. macrocephala*, *C. bracteata*, *C. indurata*, *C. nigrescens*, *C. ruthenica*, *C. adjarica*, *C. arenaria*, *C. jacea*, *C. cyanoides*, *C. melitensis*, *C. cataonica*, *C. dealbata*) mintáját gyulladáscsökkentő hatásra irányuló *in vitro* szűrővizsgálat céljára begyűjtöttem.



*C. sadleriana* Janka

### 2. FITOKÉMIAI VIZSGÁLAT

A *Centaurea sadleriana* minta fitokémiai vizsgálata lezárult. A növény metanollal történő extrakcióját követően a betöményített és vízzel hígított kivonatot *n*-hexánnal és kloroformmal történő folyadék-folyadék megosztással frakcionáltam. A hexánnal és kloroformmal nyert frakciók folyadékkromatográfiás elválasztása során nyert 13-13 frakció kromatográfiás tisztítása megtörtént (oszlopkromatográfia, vákuum-folyadékkromatográfia, centrifugális planárokromatográfia, MPLC, HPLC, preparatív rétegekromatográfia). Ennek eredményeként 18 tiszta vegyületet izoláltam, amelyek közül 12 szerkezetét NMR és HR-MS módszerek segítségével határoztam meg. Az azonosított vegyületek közé tartozik a pektolinarigenin, a szalvigenin, a hispidulin, a krizoeriol, az apigenin, a luteolin (flavonoidok), a gamma- és alfa-linolénsav, a béta-szitoszterin, a sztigmatsterin és a kampszterin, valamint a vanillin. További 6 vegyület szerkezetének felderítése folyamatban van.

A tizenkét begyűjtött *Centaurea* faj mintáinak frakcionált kivonása *in vitro* gyulladáscsökkentő vizsgálatra megtörtént. Ugyanezekkel a fajokkal (a pályázatban nem vállalt) a polifenolos vegyületekre vonatkozó összehasonlító kémiai elemzés folyamatban van.

### 3. FARMAKOLÓGIAI VIZSGÁLAT

#### 3.1. GYULLADÁSCSÖKKENTŐ HATÁS *IN VITRO* VIZSGÁLATA

A kivonatok *in vitro* gyulladáscsökkentő hatását COX-1, COX-2 és 5-LOX enzimgátláson alapuló tesztek segítségével vizsgáltuk, zileuton (10 µM, 5-LOX), indometacin (0,9 µM, COX-1) és NS-398 (2,6 µM, COX-2) pozitív kontrollok alkalmazásával.-A *C. sadleriana* kivonatai (CSE-1: vizes kivonat; CSE-2: metanolos kivonat; CSE-3: metanolos kivonatból *n*-hexános folyadék-folyadék megosztással nyert frakció; CSE-4: metanolos kivonatból kloroformos folyadék-folyadék megosztással nyert frakció) 50 µg/ml koncentrációban *in vitro* jelentős COX-1, COX-2 és 5-LOX enzimgátló hatást mutattak (1. táblázat).

1. táblázat *C. sadleriana* kivonatainak *in vitro* enzimgátló hatása

| Kivonat | COX-1 gátlás (%) | COX-2 gátlás (%) | 5-LOX gátlás (%) |
|---------|------------------|------------------|------------------|
| CSE-1   | -40,33±5,65      | -23,58±11,97     | -29,21±10,38     |
| CSE-2   | -5,43±11,73      | 25,11±3,45       | -10,99±14,27     |
| CSE-3   | 80,71±4,56       | 90,39±2,94       | 53,23±6,29       |
| CSE-4   | 76,09±6,65       | 86,92±5,66       | 47,49±9,30       |

A *C. sadleriana* kivonatából nyert *n*-hexános kivonatok frakcióinak *in vitro* gyulladáscsökkentő hatásra (COX-1, COX-2 és 5-LOX enzimgátló aktivitás) irányuló szűrővizsgálata megtörtént (2. táblázat). A vizsgálatok igazolták az előzetesen a növény nyers kivonata esetén tapasztalt gyulladáscsökkentő hatást és a kromatográfiás elválasztás sikerességét, a frakciók egy része ugyanis kiemelkedő aktivitást mutatott, mások viszont inaktívak voltak. Több frakció esetén kimagasló hatásosság volt megfigyelhető. A COX-1 gátló hatásra vizsgált 13 kivonatból 6, COX-2 gátló hatást tekintve 6, 5-LOX gátló hatást illetően 6 frakció esetén volt megfigyelhető 60%-osnál nagyobb gátlás. A kloroformos frakciók esetén nem volt tapasztalható 60%-ot elérő aktivitás. A szűrővizsgálatok eredményeinek ismeretében a további kromatográfiás feldolgozás elsősorban a kiemelkedő aktivitású frakciókra irányult. Mivel az izolált vegyületek gyulladáscsökkentő hatása az irodalomban ismert, ilyen jellegű vizsgálatokra nem került sor.

2. táblázat *C. sadleriana* kivonatfrakciók *in vitro* enzimgátló hatása

| Frakció          | COX-1 gátlás (%) |       | COX-2 gátlás (%) |       | 5-LOX gátlás (%) |       |
|------------------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|
|                  | átlag            | SD    | átlag            | SD    | átlag            | SD    |
| CS-H-I           | -7,02            | 7,06  | -16,68           | 20,60 | 14,82            | 1,29  |
| CS-H-II          | 54,38            | 5,25  | 83,86            | 3,66  | 12,02            | 7,46  |
| CS-H-III         | 5,62             | 6,25  | 3,90             | 20,34 | -16,14           | 41,14 |
| CS-H-IV          | 59,61            | 9,44  | 79,53            | 8,09  | 86,58            | 9,13  |
| CS-H-V           | 71,18            | 3,97  | 92,18            | 3,18  | 85,86            | 17,68 |
| CS-H-VI          | 66,42            | 11,32 | 87,12            | 13,12 | 80,52            | 8,99  |
| CS-H-VII         | 82,45            | 8,41  |                  |       | 75,88            | 7,90  |
| CS-H-VIII        | 83,31            | 6,44  |                  |       | 71,68            | 11,72 |
| CS-H-IX          | 61,30            | 3,73  | 80,35            | 7,02  | 70,16            | 7,43  |
| CS-H-X           | 32,10            | 7,29  | 23,43            | 11,47 | 52,18            | 16,54 |
| CS-H-XI          | 13,88            | 11,12 | 70,52            | 2,19  | 48,24            | 22,79 |
| CS-H-XII         | 10,54            | 9,67  | 52,34            | 6,97  | 48,20            | 11,01 |
| CS-H-XIII        | 12,29            | 12,80 |                  |       | 38,56            | 20,95 |
| pozitív kontroll | 44,56            | 10,29 | 62,70            | 2,47  | 71,16            | 8,11  |

A 12 további begyűjtött *Centaurea* faj közül a *C. macrocephala*, *C. bracteata*, *C. indurata*, *C. nigrescens*, *C. ruthenica*, *C. adjarica*, *C. cyanooides*, *C. melitensis*, *C. cataonica*, *C. dealbata* kivonatainak *in vitro* gyulladáscsökkentő vizsgálata lezárult (**3. táblázat**). A felsorolt fajok föld feletti részének *n*-hexánnal (A frakció), kloroformmal (B frakció), metanollal (C frakció) és vízzel (D frakció) készült kivonatainak hatását vizsgáltuk COX-1 és COX-2 enzimeken, 50 µg/ml koncentrációban. A növények *n*-hexános kivonatai esetén a *C. sadleriana* esetén tapasztalható hasonló mértékű enzimgátló hatást tapasztaltunk. A *C. jacea* és *C. arenaria* kivonatainak *in vitro* gyulladáscsökkentő vizsgálata folyamatban van.

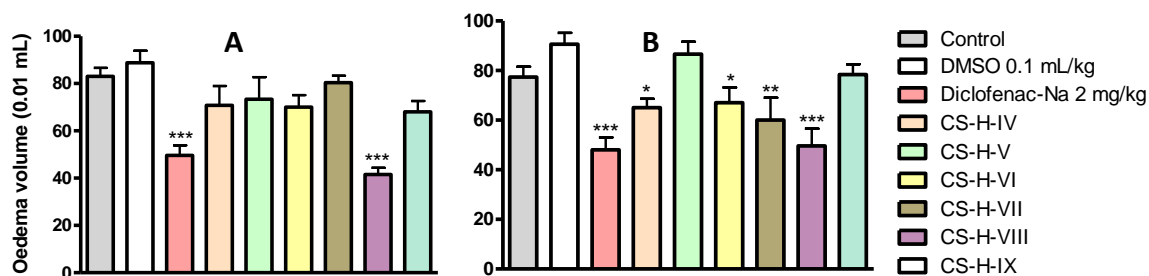
**3. táblázat** *Centaurea* fajok kivonatfrakcióinak *in vitro* enzimgátló hatása

| Faj                    |       | A frakció |       | B frakció |       | C frakció |       | D frakció |       |
|------------------------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
|                        |       | Gátlás %  | SD    | Gátlás %  | SD    | Gátlás %  | SD    | Gátlás %  | SD    |
| <i>C. adjarica</i>     | COX-1 | 68,76     | 5,53  | 27,06     | 10,11 | -23,82    | 22,79 | -17,52    | 15,60 |
|                        | COX-2 | 71,00     | 2,14  | 35,34     | 4,54  | -4,21     | 10,64 | 6,91      | 13,99 |
| <i>C. bracteata</i>    | COX-1 | 67,81     | 5,78  | 24,52     | 11,20 | -7,42     | 11,37 | -17,53    | 12,39 |
|                        | COX-2 | 60,79     | 18,69 | 21,61     | 19,14 | -28,41    | 23,09 | -25,36    | 26,19 |
| <i>C. cataonica</i>    | COX-1 | 65,72     | 11,05 | -0,28     | 28,17 | -2,70     | 6,46  | -24,26    | 20,07 |
|                        | COX-2 | 68,49     | 11,35 | 10,82     | 14,43 | 6,53      | 6,08  | 0,76      | 10,96 |
| <i>C. cyanooides</i>   | COX-1 | 66,01     | 3,13  | 10,71     | 16,27 | -21,06    | 12,56 | -18,27    | 8,72  |
|                        | COX-2 | 68,68     | 2,91  | 17,97     | 8,71  | 0,66      | 5,98  | 2,44      | 8,38  |
| <i>C. dealbata</i>     | COX-1 | 69,39     | 8,58  | 22,15     | 9,34  | -27,41    | 20,55 | -54,99    | 24,09 |
|                        | COX-2 | 61,63     | 7,01  | 24,69     | 8,86  | 3,30      | 12,61 | -6,13     | 11,23 |
| <i>C. indurata</i>     | COX-1 | 71,84     | 7,31  | 23,36     | 5,81  | -20,86    | 22,27 | -5,90     | 8,29  |
|                        | COX-2 | 71,10     | 3,22  | 38,87     | 13,23 | -13,11    | 7,87  | 10,66     | 7,55  |
| <i>C. macrocephala</i> | COX-1 | 74,73     | 5,71  | 25,60     | 14,61 | -23,39    | 8,05  | -26,57    | 15,86 |
|                        | COX-2 | 77,00     | 3,18  | 22,87     | 6,58  | 6,40      | 10,66 | -0,28     | 10,37 |
| <i>C. melitensis</i>   | COX-1 | 53,50     | 10,49 | 5,88      | 6,72  | -8,81     | 11,29 | -10,48    | 6,83  |
|                        | COX-2 | 71,82     | 11,53 | 18,78     | 8,25  | 0,83      | 7,61  | -0,51     | 6,00  |
| <i>C. nigrescens</i>   | COX-1 | 72,77     | 7,54  | 24,17     | 16,44 | -2,17     | 10,25 | 5,90      | 6,85  |
|                        | COX-2 | 78,51     | 6,66  | 44,77     | 10,02 | 4,05      | 10,28 | 9,12      | 7,37  |
| <i>C. ruthenica</i>    | COX-1 | 69,34     | 5,33  | 9,74      | 5,75  | 3,08      | 6,83  | -5,71     | 9,67  |
|                        | COX-2 | 78,27     | 7,47  | 18,37     | 6,90  | 6,53      | 6,08  | 4,24      | 6,34  |

### 3.2 GYULLADÁSCSÖKKENTŐ HATÁS *IN VIVO* VIZSGÁLATA

Az *in vitro* gyulladáscsökkentő hatásra irányuló vizsgálatban kimagasló aktivitású *C. sadleriana* kivonatfrakciók *in vivo* gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálatát elvégeztük. A vizsgálatokat hím Sprague-Dawley patkányokon, a kivonat egyszeri adagolásával *per os* vagy parenterális adagolásával végeztük carrageenan-indukált gyulladással modell alkalmazásával. Orális adagolás mellett egy, intraperitoneális adminisztráció esetén 4 kivonatfrakció mutatott a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns, az aktív kontroll diclofenachhoz hasonló intenzitású gyulladáscsökkentő hatást (**1. ábra**). Ezen eredményeket figyelembe vettük a kivonatok

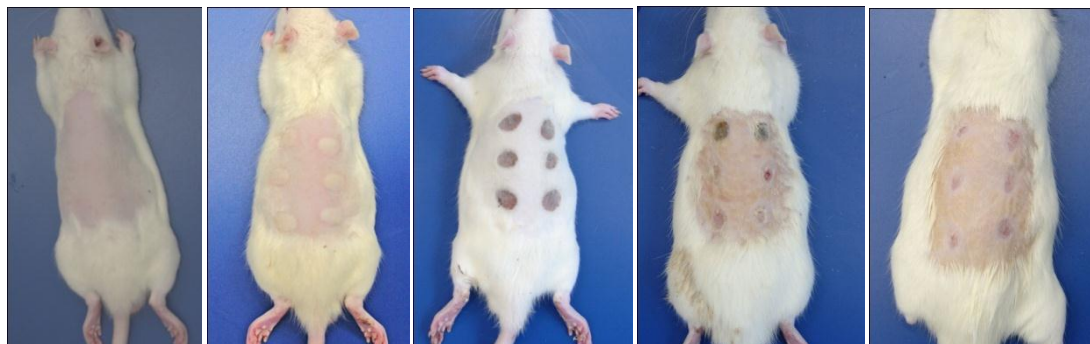
további kromatográfiai tisztításánál. Az izolált vegyületek kis mennyisége nem tette lehetővé hatásuk *in vivo* tanulmányozását.



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

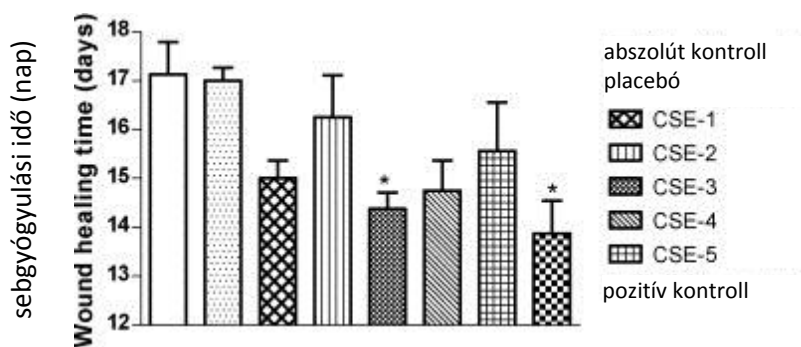
### 3.2. SEBGYÓGYULÁST ELŐSEGÍTŐ HATÁS *IN VIVO* VIZSGÁLATA

A sebgyógyulást elősegítő hatás *in vivo* vizsgálata során 5 frakció hatásosságát tanulmányoztuk: a *C. sadleriana* metanolos kivonatának folyadék-folyadék megosztásával nyert *n*-hexános és kloroformos frakciót, az eredeti és a kirázás után visszamaradó metanolos kivonatot, illetve a növény forró vizes kivonatát. A növényből izolált vegyületek kis mennyisége nem tette lehetővé hatásuk *in vivo* tanulmányozását. A kivonatok Carbomer gélben szuszpendálva alkalmaztuk. A vizsgálatot nőstény Sprague-Dawley patkányokon végeztük (csoportonként 8 állat). A vizsgálat során az állatok hátán hőhatással előidézett sebeket (állatonként 6, standard méretű seb) kezeltük a vizsgált kivonatokot tartalmazó készítményekkel. A hatásosságot a sebek felének leeséséig eltelt idővel mértük.



2. ábra Kísérleti állat seb előidézése előtt, közvetlenül égetés után, majd a sebgyógyulás stádiumai

A kezelés hatásosságát kezelésben nem részesült (abszolút kontroll), placebóval (a gél vivőanyaga) kezelt, illetve aktív kontrollal (szalicilsavat tartalmazó gél) kezelt állatokhoz hasonlítottuk. Mindegyik növényi kivonat gyorsította a sebgyógyulást az abszolút kontrollhoz és a placebóhoz viszonyítva, statisztikailag szignifikáns (az aktív kontrollal összevethető) hatásosság az *n*-hexános frakció esetén volt megfigyelhető. A sebek felének leeséséig eltelt idő az abszolút kontrollcsoportban átlagosan 17,2 nap, a placebókezelést kapott csoportban 16,5 nap, a hexános frakcióval kezelt csoportban 14,4 nap volt. A növény vizes kivonata esetén (ehhez hasonló extraktumot alkalmaznak a népi gyógyászatban) jelentős gyógyulási idő rövidülés (>2 nap) volt megfigyelhető (3. ábra). Ezen eredményeket figyelembe vettük a kivonatok további kromatográfiai tisztításánál.



3. ábra A *Centaurea* kivonatok hatása a sebgyógyulásra ( $p < 0.05$  a placebóhoz viszonyítva)

#### 4. ÖSSZEFOGLALÁS

Az munkatervben vállalt feladatok teljesítése a tervek szerint megtörtént. Eredményeink igazolják a *C. sadleriana* népi gyógyászatban megfigyelt sebgyógyulást gyorsító hatását, és a növényből kiemelkedő gyulladáscsökkentő aktivitású frakciókat is azonosítottunk. A növény kivonatából több gyulladáscsökkentő hatású vegyületet izoláltunk. A *C. sadleriana* fitokémiai, valamint *in vitro* és *in vivo* gyulladáscsökkentő és sebgyógyulást elősegítő hatásra történő vizsgálata lezárult. Eredményeimről 3 tudományos közleményben (ebből 2 közlés alatt) és 4 konferenciaelőadásban számoltam be.

További 10, Kárpát-medencében honos vagy természetű faj *in vitro* gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata igazolta, hogy a rokon, hasonló összetételű fajok a *C. sadlerianához* hasonló mértékű hatással bírnak. Az esetleges gyógyászati felhasználás szempontjából a termesztésbe vont, illetve a vadon nagy mennyiségben megtalálható fajok perspektívikusnak tűnnek a kizárólag a Kárpát-medencében honos, védett *C. sadlerianával* szemben.