

A *Carpinus betulus* fenoloidprofiljának és ciklusos diarilheptanoidjainak fitokémiai vizsgálata

Doktori tézisek

Felegyi-Tóth Csenge Anna

Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Semmelweis Egyetem



Témavezető: Dr. Alberti Ágnes, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Mazákné dr. Kraszni Márta, Ph.D.

Dr. Csupor Dezső, D.Sc.

Komplex vizsga szakmai bizottság elnöke:

Dr. Antal István, Ph.D.

Komplex vizsga szakmai bizottság tagjai:

Dr. Gonda Sándor, Ph.D.

Dr. Tóth Gergő, Ph.D.

Budapest

2024

1. Bevezetés

A fitoterapeutikumok, ill. a természetes, növényi eredetű gyógyszerek iránti érdeklődés folyamatosan növekszik, így egyre több kutatás összpontosít a (gyógy)növényekre és azok potenciálisan aktív vegyületeire. Ugyanakkor a növényi hatóanyagok kutatását megnehezíti a növényi kivonatok rendkívül komplex összetétele. Gyakran nagyon nehéz azonosítani azokat az aktív komponenseket, amelyek a gyógynövény biológiai hatásáért felelősek. Ezekhez a vizsgálatokhoz általában szükséges a modern műszeres analitikai módszerek, például ultra- és nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (UHPLC, HPLC) és tömegspektrometriás technikák (MS) alkalmazása.

A speciális (másodlagos) növényi anyagcseretermékek egyik ígéretes csoportjába tartoznak a diarilheptanoidok, amelyek napjainkban antiproliferatív, neuroprotektív és gyulladáscsökkentő aktivitásuk miatt kerültek a tudományos érdeklődés középpontjába. Az elmúlt években számos tanulmány, kísérlet és klinikai vizsgálat foglalkozott ezekkel a molekulákkal, az izolált vegyületeket és az azokat tartalmazó növényi kivonatokot egyaránt vizsgálták. A legismertebb és leginkább kutatott diarilheptanoid vegyület a kurkumin, amely a lineáris diarilheptanoidok közé tartozik. Azonban meg kell jegyezni, hogy előnytelen farmakokinetikai tulajdonságai és rossz kémiai stabilitása korlátozza a terápiában való alkalmazását. A Betulaceae családba tartozó növényekből szintén izoláltak már ígéretes diarilheptanoidokat, bár vannak még "felfedezetlen" fajok a családban, mint például a közönséges gyertyán (*Carpinus betulus*). Bár a gyertyánt hosszú ideje használják a faiparban, a népi gyógyászatban nem terjedt el széleskörű alkalmazása. A *C. betulus* fitokémiai és farmakológiai jellemzése korlátozott, a publikált kutatások jellemzően más *Carpinus*-fajokra összpontosítanak, például a *C. turczaninowii*-ra, melyből gyűrűs diarilheptanoid-származékokat azonosítottak. A közönséges gyertyánban eddig diarilheptanoidokat nem, azonban más fenoloidokat, például hidrolizálható cserzőanyagokat, flavonoidokat, illetve hidroxifahéjsavakat detektáltak. Érdeemes tehát a fa teljeskörű fitokémiai vizsgálatát folytatni és a szakirodalmi adatok alapján feltételezhetően jelenlévő diarilheptanoidokról részletes farmakognóziái adatokat gyűjteni.

2. Célkitűzések

A *Carpinus betulus* szakirodalmi jellemzése hiányos, különböző növényi részeinek fenoloidprofilját ezidáig nem vizsgálták és nem hasonlították össze, jellemző komponenseinek kémiai, farmakológiai és farmakokinetikai tulajdonságait nem tanulmányozták. Mindezek alapján munkánk főbb célkitűzései a következők voltak:

- A közönséges gyertyán különböző részeiből készült (kéreg, levél, porzós és termős virágzat) kivonatok fenoloid-ujjlenyomatának feltérképezése nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás–tandem tömegspektrometriás (HPLC-DAD-MS/MS) módszerrel.
- A diarilheptanoidok feltételezett jelenlétének igazolása, a jellemző vegyületek izolálása és szerkezetmeghatározása, valamint MS/MS fragmentációs útvonalának feltérképezése.
- A kivonatok és izolált vegyületek *in vitro* antioxidáns aktivitásának meghatározása DPPH módszerrel. Az egyes komponensek hozzájárulásának vizsgálata a kivonatok szabadgyök-semlegesítő aktivitásához off-line DPPH-HPLC-DAD módszerrel.
- Ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfiás (UHPLC-DAD) módszer fejlesztése és validálása a legnagyobb mennyiségben jelenlévő diarilheptanoidok mennyiségi meghatározására.
- A fő diarilheptanoidok kémiai stabilitásának vizsgálata: a tárolási idő, a hőmérséklet, az oldószer, illetve a pH-érték stabilitást befolyásoló hatásának tanulmányozása.
- A domináns diarilheptanoidok membránpenetrációs vizsgálata *in vitro*, nem sejtes, szövetspecifikus (PAMPA-BBB és PAMPA-GI) modellek segítségével.
- A fő diarilheptanoidok *in vitro* antiproliferatív hatásának vizsgálata.

3. Módszerek

3.1. Növényminta

A növénymintákat (kéreg, levél, porzós és termős virágzat) vadon növő állományból, különböző időpontokban és különböző helyszíneke gyűjtöttük: a kvalitatív HPLC-MS/MS, az antioxidáns aktivitás, a kvantitatív UHPLC-DAD és a

stabilitásvizsgálatokban elemzett mintákat 2015 áprilisában a Budai-hegységben, 2016 májusában Mátraházán és 2018 júliusában a Visegrádi-hegységben, míg a vegyületek izolálásához felhasznált kéregmintákat 2017 májusában Mátraházán és 2019 májusában Lajosházán.

3.2. Kivonás és mintaelőkészítés

3-3 g homogenizált, majd szobahőmérsékleten szárított növénymintából Soxhlet-készülékkel készítettünk kivonatokat. Az oldószereket egymást követően, növekvő polaritás szerinti sorrendben alkalmaztuk (250-250 ml kloroform, etil-acetát és metanol), 6-6 óráig extrahálva a mintákat.

A kivonatokat rotációs vákuumbepárló segítségével szárazra pároltuk, HPLC-minőségű metanolban oldottuk, majd regenerált cellulóz (0,2 µm) fecskendőszűrő segítségével szűrtük. A mintákat a vizsgálatok előtt ismételten beszárítottuk és 70%-os metanolban oldottuk vissza.

3.3 Vegyületek izolálása és szerkezetmeghatározása

A vegyületek izolálásának céljából 500 g kéregdrogból indultunk ki. A kivonásra ultrahanggal segített extrakciót alkalmaztunk kloroform, etil-acetát, illetve metanol oldószert használtunk (3 × 2 l, 2 órán keresztül).

Az etil-acetátos és metanolos kivonatot tisztítottuk tovább flash kromatográfiás módszerrel (CombiFlash NextGen 300 készülék), RediSep Rf Gold C18 (100 g) oszlopot, valamint mozgófázisként 0,3% (v/v) ecetsavas vizes oldatot (A eluens) és metanolt (B eluens) alkalmazva. A kivonatból nyert frakciók tisztításához különböző szemipreparatív HPLC-módszereket fejlesztettünk a frakciók minőségi és mennyiségi tulajdonságaitól függően Waters Alliance 2690 HPLC készüléken.

A vegyületek azonosításához nagyfelbontású tömegspektrometriás és NMR technikákat alkalmaztunk. Az UHPLC-ESI-Orbitrap-MS/MS vizsgálatokat Dionex Ultimate 3000 UHPLC készüléken és kapcsolt Orbitrap Q Exactive Focus tömegspektrométeren végeztük, az elektroporlasztásos ionforrást (ESI) negatív ionizációs üzemmódban működtettük.

Az NMR méréseket 600 MHz-es Varian DDR NMR spektrométeren 5 mm IDPFG mérőfejjel, illetve Bruker Avance III 400 (400/100 MHz) 5 mm IDPFG mérőfejjel

és BRUKER AVANCE III HD 600 (600/150MHz) Prodigy kriomérőfejjel végeztük. A mintákat deuterált metanolban vagy dimetil-szulfoxidban oldottuk. Az izolált vegyületek teljes ^1H és ^{13}C jelhozzárendelését (teljes asszignáció esetén) egydimenziós [^1H NMR, ^{13}C NMR, DeptQ], ill. kétdimenziós homo- és heteronukleáris kísérletek alapján valósítottuk meg [^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C edHSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^1H NOESY vagy ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^1H TOCSY].

3.4. Kvalitatív fitokémiai vizsgálatok

A HPLC-MS vizsgálatok során Agilent 1100 HPLC berendezéssel kapcsolt Agilent 6410 hármas kvadrupól tömegspektrométerrel dolgoztunk, az elektroporlasztásos ionforrást negatív ionizációs üzemmódban működtettük. A kromatográfiás elválasztáshoz állófázisként Zorbax SB-C18 (150 × 3,0 mm, 3,5 μm) oszlopot, mozgófázisként 0,3% (v/v) ecetsavas vizes oldatot (A eluens) és metanolt (B eluens) alkalmaztunk. A kromatogramokat 220, 290 és 340 nm-en detektáltuk. A vegyületek azonosításához retenciós idejüket, UV- és tömegspektrumaikat irodalmi adatokkal hasonlítottuk össze.

3.5. *In vitro* antioxidáns aktivitás vizsgálata

A kivonatok és az izolált vegyületek antioxidáns aktivitását 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH \cdot) szabadgyök semlegesítési reakciójában, spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg. A vizsgálatokat a DPPH \cdot -ra jellemző hullámhossznál, 515 nm-en detektálva végeztük. Összehasonlításként trolox és rutin referencia vegyületeket vizsgáltunk.

A kivonatokban jelenlévő komponensek hozzájárulását a kivonat teljes antioxidáns aktivitásához DPPH-val történő egy órás, sötétben történő inkubálást követően HPLC-DAD-MS módszerrel határoztuk meg. A hidrogendonor-aktivitást az egyes komponensek görbe alatti területértékeinek (AUC) csökkenése jelezte. A csökkenés mértékét %-os értékkel fejeztük ki, azonos koncentrációjú, DPPH-val nem kezelt kivonatok AUC-értékeivel összehasonlítva.

3.6. Kvantitatív fitokémiai vizsgálat

A közönséges gyertyánban legnagyobb mennyiségben előforduló diarilheptanoid vegyületek (**106, 149, 154, 157**) mennyiségi analízise céljából UHPLC-DAD külső standard kalibrációs módszert alkalmaztunk és validáltunk. Acquity BEH C18 oszlopot ($100 \times 2,1$ mm, $1,7 \mu\text{m}$) alkalmaztunk állófázisként, a mozgófázis 0,3% ecetsavas víz (A eluens) és acetonitril (B eluens) volt. A kromatogramokat 295 nm-en detektáltuk.

3.7. Stabilitásvizsgálatok

A *C. betulus* kéreg domináns diarilheptanoidjainak (**106, 149, 154, 157**) stabilitását kétféle oldószerben vizsgáltuk: metanolban, illetve vízben ($50 \mu\text{g/ml}$). Tanulmányoztuk emellett a vegyületek stabilitását összetett mátrixokban: a kéregmintából nyert metanolos és etil-acetátos kivonatokban (4 mg/ml) is. Az oldatokat és kivonatokat három különböző hőmérsékleten, $22 \text{ }^\circ\text{C}$, $5 \text{ }^\circ\text{C}$ és $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk. A kéthetente vett mintákban UHPLC-DAD módszerrel mértük a vizsgált diarilheptanoidok mennyiségét. A vegyületek stabilitásának meghatározásához a kezdeti értékeket hasonlítottuk össze a 12. heti és a 23. heti adatokkal páros T-próba segítségével ($p < 0,05$). Az oldószer és a hőmérsékelt hatását a vegyületek stabilitására egyutas varianciaanalízis (ANOVA, analysis of variance) segítségével értékeltük, melyet Tukey-féle poszt hoc teszt követett ($p < 0,05$).

Elemeztük továbbá a pH-érték hatását a négy fő diarilheptanoid (**106, 149, 154, 157**) stabilitására, a vizsgálatokat pH 1,2; pH 6,8; és pH 7,4 fiziológiás pH-értékeken végeztük. A vizsgált vegyületek 10 mmol/l -es dimetil-szulfoxiddal készült törzsoldatából százszoros hígításokat készítettünk a megfelelő pufferekkel. A mintákat 81 órán keresztül $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk, mintavétel kilenc óránként történt, a minták koncentrációját UHPLC-DAD-módszerrel vizsgáltuk. Az inkubált minták UV-kromatogramjainak AUC-adatait hasonlítottuk össze a kezdeti csúcs alatti területértékekkel páros T-próba segítségével ($p < 0,05$). A pH hatását a vegyületek stabilitására ANOVA segítségével értékeltük, melyet Tukey-féle poszt hoc teszt követett ($p < 0,05$).

3.8. Membránpermeabilitás vizsgálatok

A négy domináns diarilheptanoid (**106, 149, 154, 157**) membránpermeabilitásának vizsgálatát PAMPA-módszerrel végeztük. A vér-agy gáton

(PAMPA-BBB) és a gasztrointesztinális traktuson (PAMPA-GI) keresztüli membránpermeációt szimuláltuk. A két modellben eltérő összetételű, szövetspecifikus membránokat alkalmaztunk. A PAMPA-BBB modellben a donorközeg pH-értéke 7,4, PAMPA-GI esetén 6,8 volt, míg az akzeptorközeg mindkét esetben 7,4-es pH-értékű foszfátpuffer volt.

A vizsgált diarilheptanoidok 10 mmol/l koncentrációjú dimetil-szulfoxiddal készült törzsoldatából százszoros hígításokat készítettünk az adott modellben alkalmazott donorközegnek megfelelő pufferekkel. A 4 órán át tartó, 37 °C-on történő inkubálás után mintát vettünk mind a donor-, mind az akceptorfázisból, a minták koncentrációját UHPLC-DAD-módszerrel vizsgáltuk. A kapott értékekből effektív permeabilitási értékeket számoltunk.

3.9. Antiproliferatív hatás vizsgálata

A fő diarilheptanoidok (**106, 149, 154, 157**) *in vitro* sejtosztódást gátló hatását a HUN-REN-ELTE peptidkémiai kutatócsoport munkatársaival együttműködésben vizsgáltuk. A vizsgálatokat Alamar Blue-teszt segítségével végeztük az alábbi humán eredetű sejtvonalakon: A2058 metasztatikus melanóma, HepG2 hepatoblasztóma, HL-60 leukémia, HT-29 kolorektális karcinóma, U87 glioblasztóma. A vegyületeket 0,16-100 µM koncentrációtartományban vizsgáltuk, pozitív kontrollként daunomicint, etopozidot és 5-kloro-2-hidroxi-*N*-[4-(trifluorometil)fenil]benzamidot alkalmaztunk.

4. Eredmények

4.1. Kvalitatív fitokémiai vizsgálat

Mivel a *C. betulus* fitokémiai összetételére vonatkozó szakirodalmi adatok hiányosak, fenoloidprofiljának teljeskörű feltérképezésére különböző növényi részekből, növekvő polaritás szerinti sorrendben készítettünk kivonatokat. HPLC-DAD-MS/MS módszerrel végzett vizsgálataink alapján 194 vegyületet feltételeztünk az extraktumokban. A fő célunk a fenoloid-ujjlenyomat vizsgálata volt, ezért a kloroformmal készült kivonatokat, amelyek elsősorban apoláris komponenseket tartalmaztak, nem vizsgáltuk.

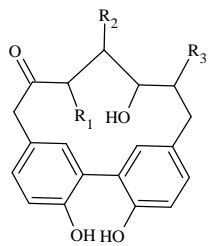
Az etil-acetáttal készült kivonatok változatosabb fenoloidösszetételt mutattak, mint a metanollal készült minták. Nagyobb intenzitással detektáltunk hidroxifahéjsavszármazékokat, illetve flavonoid-glikozidokat. Metanollal, polárisabb jellegéből adódóan, a polihidroxi-csoportokkal rendelkező vegyületeket extraháltuk, melyek döntően a galluszsavszármazékok, ellagitanninok és gallotanninok csoportjába tartoztak.

A különböző növényi részek kivonatainak fenoloidösszetétele között is tapasztaltunk különbségeket. A kéregben a galluszsavszármazékok domináltak, illetve gyűrűs diarilheptanoidokat detektáltunk a kivonatokban, és elsőként azonosítottunk nyílt egy láncú diarilheptanoidot a *Carpinus* nemzetségben belül. A levél esetén sokszínűbb fitokémiai összetételt írtunk le: az etil-acetátos mintában a hidroxifahéjsav-származékok és flavonoid-glikozidok voltak a meghatározóak, azonban detektáltunk galluszsavszármazékokat is. A termős és porzós virágzat minták esetén ugyancsak változatos fenoloidösszetételt figyeltünk meg.

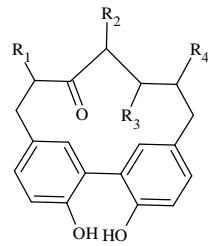
4.2. Vegyületek izolálása és szerkezetmeghatározása

Az általunk izolált vegyületeket az **1. ábra** szemlélteti. Hat ismert ciklikus diarilheptanoidot [karpinontriol A (**106**) és B (**149**), giffonin U (**114**) és giffonin X (**157**), kazuarinondiol (**161**), 3,12,17-trihidroxitriciklo[12.3.1.1^{2,6}]-nonadeka-1(18),2(19),3,5,14,16-hexaén-8,11-dion (**154**)] és egy új származékot [3,11,17-trihidroxitriciklo[12.3.1.1^{2,6}]-nonadeka-1(18),2(19),3,5,14,16-hexaén-8-on (**187**)] izoláltunk először *Carpinus betulus*ból.

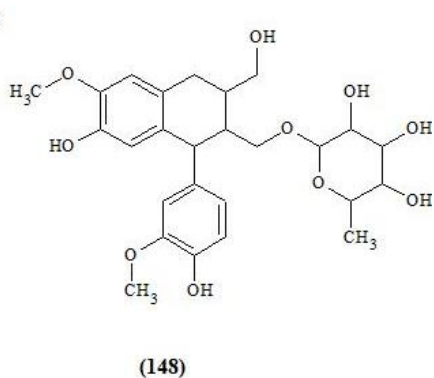
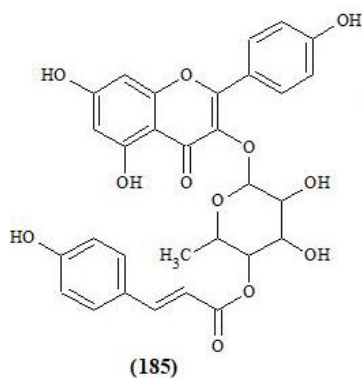
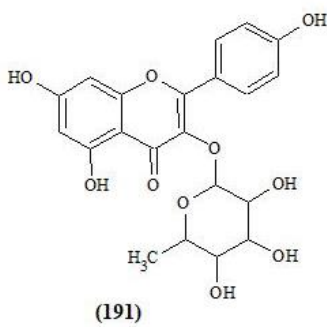
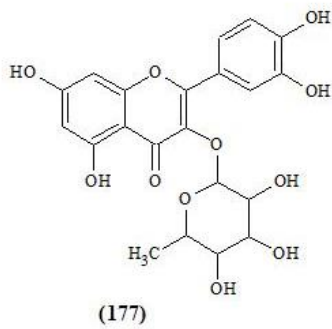
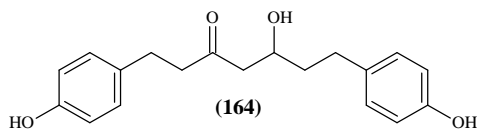
Emellett egy lineáris diarilheptanoidot [5-hidroxi-1,7-bisz-(4'-hidroxifenil)-3-heptanon (**164**)] és egy lignánt [avikulin (**148**)] is először írtunk le a *Carpinus* nemzetségben. Továbbá három ismert flavonol-glikozidot [kvercetin-3-*O*-ramnozid (**177**), kempferol-3-*O*-(4''-*E-p*-kumaroil)-ramnozid (**185**), kempferol-3-*O*-ramnozid (**191**)] is izoláltunk a kéregkivonatokból. A *meta,meta*-ciklofán szerkezetű ciklikus diarilheptanoidok tömegspektrometriás fragmentációjára javaslatot tettünk (**2. ábra**).



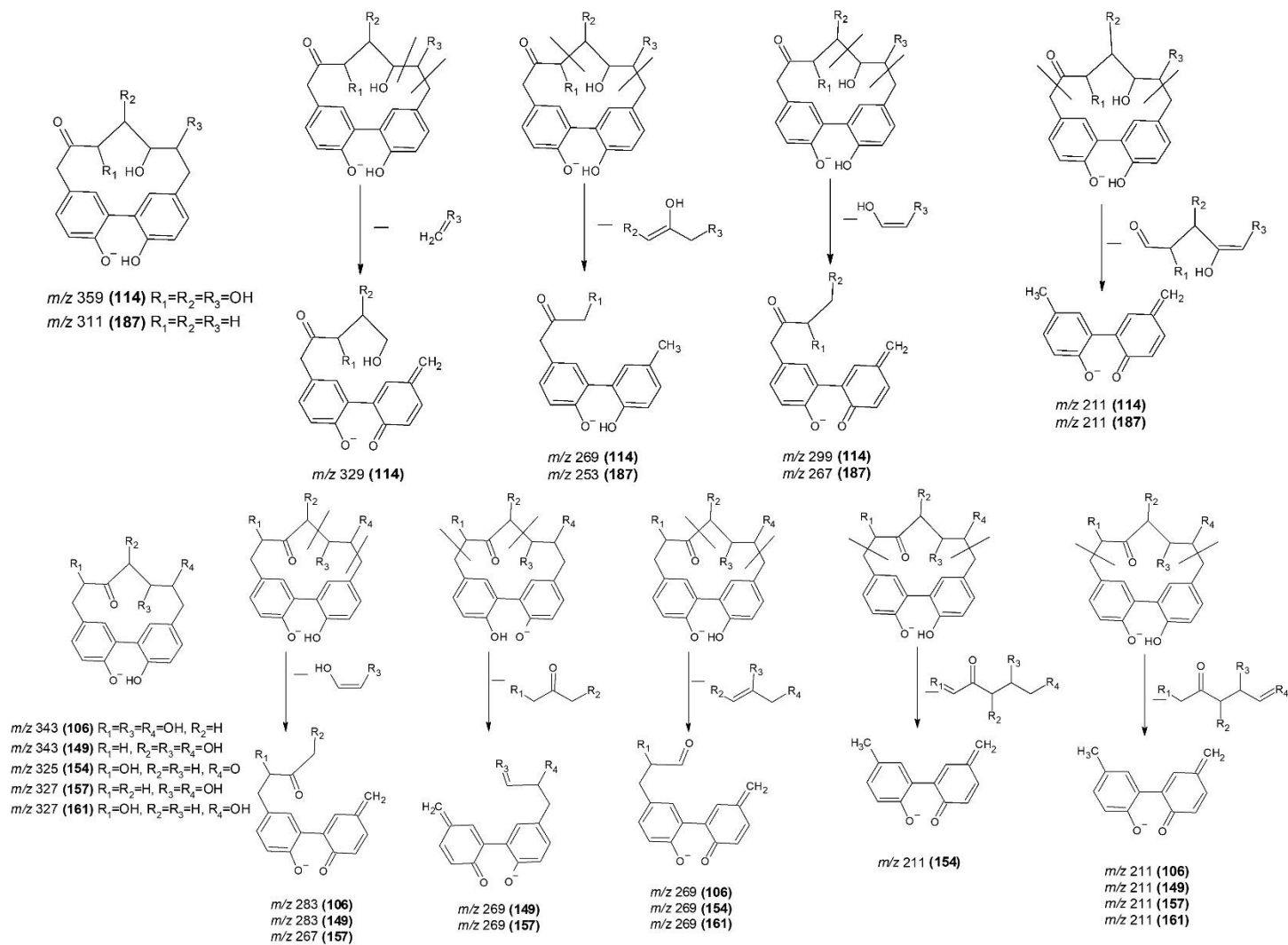
(114) $R_1=R_2=R_3=OH$
 (187) $R_1=R_2=R_3=H$



(106) $R_1=R_3=R_4=OH, R_2=H$
 (149) $R_1=H, R_2=R_3=R_4=OH$
 (154) $R_1=OH, R_2=R_3=H, R_4=O$
 (157) $R_1=R_2=H, R_3=R_4=OH$
 (161) $R_1=OH, R_2=R_3=H, R_4=OH$



1. ábra: A közönséges gyertyánból izolált vegyületek



2. ábra: A *meta,meta*-ciklofán típusú diarylheptanoidok javasolt tömegspektrometriás fragmentációs útvonala

4.3. Kvantitatív fitokémiai vizsgálat

A négy fő ciklusos diarilheptanoid (**106**, **149**, **154**, **157**) mennyiségi meghatározására külső standard kalibrációs UHPLC-DAD módszert fejlesztettünk és validáltunk. A korrelációs együttható értékei alapján megállapítható, hogy a linearitás jó ($r^2 \geq 0,9995$) a vizsgált koncentrációs tartományban (1-250 $\mu\text{g/ml}$) minden minta esetén. A LOD és LOQ értékei 0,1-0,2 $\mu\text{g/ml}$, valamint 0,3-06 $\mu\text{g/ml}$ közé esnek. A napon belüli és a napok közötti ismételhetőség alacsony, közepes és magas koncentrációk esetén is elfogadható (0,15-3,33 RSD%), míg a napon belüli és a napok közötti torzítatlanság értékei nagyobb tartományon belül változtak: 80,3-107,1% között. Mind a négy vegyület retenciós idejének ismételhetősége megfelelő, relatív szórásuk 0,18-0,58% közé esett ($n = 6$). A módszer visszanyerése 96,29-114,91% között változott. Az eredmények alátámasztják, hogy a módszer megbízható és ismételhető.

Mind a kéreg etil-acetátos, mind a metanolos kivonataiban a **106** vegyület volt jelen a legnagyobb mennyiségben (13,9-19,1 mg/g száraz kivonat). A levél és a termős virágzat kivonataiban nem detektáltunk diarilheptanoidokat.

4.4 *In vitro* antioxidáns aktivitás vizsgálata

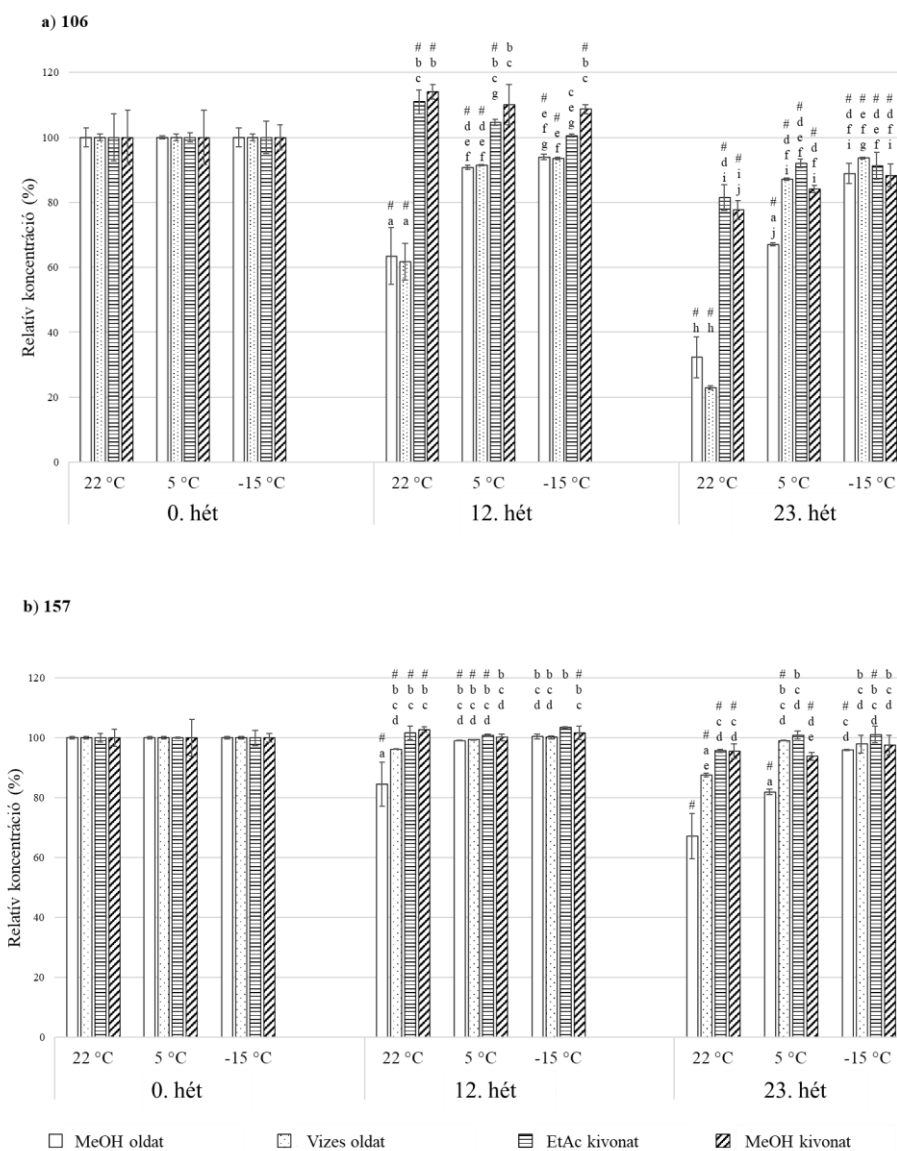
Az izolált vegyületek közül elsőként határoztuk meg az avikulin (**148**) (IC_{50} : 23,8 \pm 0,9 $\mu\text{g/ml}$) és a giffonin X (**157**) (IC_{50} : 138 \pm 11 $\mu\text{g/ml}$) DPPH gyökfogó aktivitását. A diarilheptanoidok és a lignán mérsékelt kapacitással rendelkeztek (IC_{50} : 23,8 és > 250 $\mu\text{g/ml}$ között), azonban a kvercetin-3-*O*-ramnozid (IC_{50} : 6,9 \pm 0,5 $\mu\text{g/ml}$) erőteljes szabadgyök-semlegesítő hatást mutatott.

A kivonatok szabadgyökfogó aktivitásának vizsgálata során a levél (IC_{50} : 5,5 \pm 0,2 $\mu\text{g/ml}$) és a porzós virágzat metanolos kivonata (IC_{50} : 7,6 \pm 0,3 $\mu\text{g/ml}$) mutatta a legmagasabb antioxidáns aktivitást. Az offline DPPH-HPLC vizsgálatok során arra a következtetésre jutottunk, hogy a hidrolizálható tanninok, illetve a flavonol-glikozidok lehetnek felelősek a *Carpinus*-kivonatok antioxidáns hatásáért.

4.5. Stabilitásvizsgálatok

Vizsgáltuk a tárolási idő, a hőmérséklet és a közeg (oldószer és komplex összetételű kivonatok) hatását a négy fő ciklikus *Carpinus* diarilheptanoid (**106**, **149**, **154**

és **157**) stabilitására. A karpinontriol B (**149**) és a **154** vegyület esetében nem figyeltünk meg szignifikáns koncentrációcsökkenést és nem detektáltunk bomlásterméket, így ezt a két vegyületet stabilnak minősítettük a vizsgált körülmények között. Ezzel szemben a karpinontriol A (**106**) és a giffonin X (**157**) esetén több minta is szignifikáns koncentrációváltozást mutatott az idő előrehaladtával (**3. ábra**).

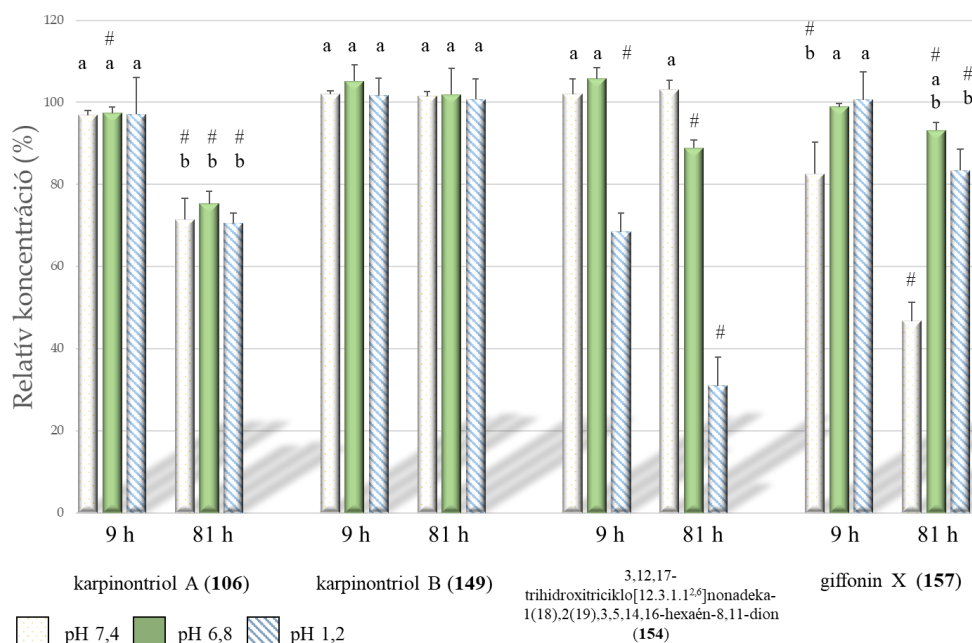


3. ábra: A tárolási idő, a hőmérséklet és a közeg hatása **(a)** a karpinontriol A (**106**) és **(b)** a giffonin X (**157**) stabilitására. # $p < 0,05$ a kezdeti mintákhoz képest. a-j: az azonos betűkkel jelölt relatív koncentrációk nem térnek el egymástól szignifikánsan ($p < 0,05$, Tukey teszt)

A **106** esetén a középtávú vizsgálatok során a -15 és 5 °C-on való tárolás egyenértékűnek bizonyult, míg a 22 °C-on való tárolás szignifikánsan kedvezőtlenebbül hatott a vegyületek stabilitására. A hosszútávú vizsgálatok során oldószertől függetlenül a -15 °C-on való tárolás volt a legelőnyösebb. A **157** esetén középtávon a metanolos oldat koncentrációváltozása 22 °C-on történő tárolás esetén szignifikánsan eltért a többi mintától. A további tárolási körülmények oldószertől és hőmérséklettől függetlenül egyenértékűnek mutatkoztak. Hosszútávon is a metanolos oldat jelentette a legkevésbé előnyös környezetet 22 és 5 °C-on.

A **106** és **157** vegyületek esetén egy-egy bomlásterméket is detektáltunk, amelyek feltehetően a **106** és **157** vegyületek vicinális diol-csoportjából történő vízkilépés során keletkeznek. A karpinontriol A esetén a bomlástermék megegyezik a **154** vegyülettel, melyet alátámaszt a retenciós idők egyezése, a **154** vegyület koncentrációjának növekedése a kivonatokban, ill. hasonló tömegspektrometriás viselkedésük.

A pH-érték stabilitásra kifejtett hatásának vizsgálata során a karpinontriol B (**149**) mindhárom vizsgált pH-értéken stabil volt, míg a **154** vegyület csak savas pH-értéknél volt instabil. Ezzel szemben a karpinontriol A (**106**) és a giffonin X (**157**) vegyületeket instabilnak minősítettük minden pH-értéken (**4. ábra**).



4. ábra: A pH hatása a domináns diarilheptanoidok stabilitására. # $p < 0,05$ a kezdeti mintákhoz képest. a-b: az azonos betűkkel jelölt koncentrációk nem térnek el egymástól szignifikánsan ($p < 0,05$, Tukey teszt)

A karpinontriol A esetén a korábban említetten felül két újabb bomlásterméket is detektáltunk HR-MS módszerrel, míg a giffonin X esetén csak a korábban is leírt, vízkilépéssel keletkező bomlásterméket detektáltuk. A **154**-es vegyület hiába bizonyult instabillnak pH 1,2 értéken, bomlásterméket nem detektáltunk.

4.6 Membránpermeabilitás vizsgálatok

A négy fő diarilheptanoid vegyület membránpenetrációs képességét a PAMPA-módszerrel vizsgáltuk. A **106**, a **149** és a **154** vegyületeket egyaránt detektáltuk az akceptor cellában a PAMPA-GI modellben, azonban $\log Pe$ értékeik $-5,0$ -nél alacsonyabbak voltak, ami gyenge membránpermeabilitásra utal.

A PAMPA-BBB vizsgálatban csak a giffonin X (**157**) volt kimutatható az akceptor fázisban, elérte a kritikus $-6 \log Pe$ értéket ($-5,92 \pm 0,04$), ami jó membránpermeációra enged következtetni. Azonban a vegyület instabilitása miatt óvatossággal kezelendő a kapott $\log Pe$ érték.

4.7 Antiproliferatív hatás vizsgálata

A négy domináns diarilheptanoid antiproliferatív aktivitását Alamar Blue-teszttel vizsgáltuk humán HT-29 vastagbélrák, HepG2 hepatocelluláris karcinóma, HL-60 leukémia, U87 glioblasztóma és A2058 metasztatikus melanoma sejtvonalakon. A karpinontriol A (**106**) szelektív citosztatikus aktivitást mutatott humán metasztatikus melanoma sejteken ($IC_{50} = 14,9 \pm 2,3 \mu M$), míg a többi sejtvonallal szemben mutatott IC_{50} -értéke, illetve a további három diarilheptanoid vegyület IC_{50} -értéke meghaladta a $100 \mu M$ koncentrációt. A kontroll etopozid ($IC_{50}: 8,9 \pm 0,2 \mu M$) és daunomicin ($IC_{50}: 0,16 \pm 0,1 \mu M$) értékeihez képest, melyek a daganatterápiában alkalmazott gyógyszerek, a karpinontriol A mérsékeltebb, de szelektív hatást mutatott a melanoma sejtvonalon.

5. Következtetések

- A közönséges gyertyán (*C. betulus*) különböző növényi részeit egymást követő lépésekben növekvő polaritású oldószerekkel vontuk ki a változatos összetétel eléréseért. Összesen 194 polifenolt feltételeztünk a kivonatokban HPLC-DAD-ESI-MS/MS módszerrel.
- Először izoláltunk hét ciklusos diarilheptanoidot a *C. betulus*ból, melyek közül a 3,11,17-trihidroxitriciklo[12.3.1.1^{2,6}]nonadeka-1(18),2(19),3,5,14,16-hexaén-8-on (**187**) az irodalomban nem ismert új vegyület. Továbbá először írtuk le lineáris diarilheptanoid és lignán vegyületek jelenlétét a *Carpinus* nemzetségen belül.
- Validált UHPLC-DAD módszert fejlesztettünk a négy fő diarilheptanoid (**106**, **149**, **154** és **157**) kvantitatív meghatározásához a gyertyánkivonatokban.
- A kivonatok és az izolált vegyületek *in vitro* antioxidáns hatását a DPPH-módszerrel vizsgáltuk. Az egyes komponensek hozzájárulását a minták szabadgyök-semlegesítő aktivitásához off-line DPPH-HPLC-DAD módszerrel mértük. Ezek alapján elsődlegesen a gallo- és ellagitannin származékok felelősek a kivonatok szabadgyökfogó kapacitásáért.
- A fő diarilheptanoidok kémiai stabilitásának értékelését a tárolási hőmérséklet (–15, 5, 22 °C) és tárolási idő (12 és 23 hét) figyelembevételével végeztük. Továbbá vizsgáltuk az oldószer és a pH (1,2; 6,8; 7,4) hatását a vegyületek stabilitására. A **149** és **154** vegyület jó stabilitást mutatott az oldatokban mindhárom hőmérsékleten, ugyanakkor csak a **149** vegyület volt stabil mindhárom vizsgált bioreleváns pH-értéken. Valószínűsítettük a **106** és **157** vegyületek degradációs útját, bomlástermékeik feltehetően egy vízmolekula kilépése során keletkeznek.
- A PAMPA-BBB vizsgálatoknál kizárólag a **157** vegyület esetén kaptunk olyan eredményt ($\log Pe -5,92 \pm 0,04$), mely arra utal, hogy a komponens passzív diffúzióval képes áthaladni a vér-agy gáton.
- A vegyületek *in vitro* antiproliferatív aktivitását öt humán eredetű daganatos sejtvonalon vizsgáltuk, megállapítva, hogy a kontrol etopozidhoz ($IC_{50} = 8,9 \pm 0,2 \mu M$) hasonló aktivitást csak a **106** vegyület ($IC_{50} = 14,9 \pm 2,3 \mu M$) mutatott A2058 sejtvonalon.

6. Saját publikációk jegyzéke

A szerző disszertációhoz kapcsolódó közleményei:

Felegyi-Tóth CA, Heilmann T, Buda E, Stipsicz B, Simon A, Boldizsár I, Bősze S, Riethmüller E, Alberti Á. (2023) Evaluation of the chemical stability, membrane permeability and antiproliferative activity of cyclic diarylheptanoids from European hornbeam (*Carpinus betulus* L.). Int J Mol Sci. 24(17):13489

Felegyi-Tóth CA, Garádi Z, Darcsi A, Csernák O, Boldizsár I, Béni S, Alberti Á. Isolation and quantification of diarylheptanoids from European hornbeam (*Carpinus betulus* L.) and HPLC-ESI-MS/MS characterization of its antioxidative phenolics. (2022) J Pharm Biomed Anal. 210:114554.

A szerző disszertációtól független közleményei:

Alberti Á, Riethmüller E, **Felegyi-Tóth CA**, Czigle S, Czégényi D, Filep R, Papp N. Phytochemical investigation of polyphenols from the aerial parts of *Tanacetum balsamita* used in Transylvanian ethnobotany and parallel artificial membrane permeability assay. Plants. 2024;13(12):1652.

Jakabfi-Csepregi R, Alberti Á, **Felegyi-Tóth CA**, Kőszegi T., Czigle, S, Papp N. (2024) A Comprehensive study on *Lathyrus tuberosus* L.: Insights into phytochemical composition, antimicrobial activity, antioxidant capacity, cytotoxic, and cell migration effects. Plants. 13(2):232.

Felegyi-Tóth CA, Osztie R, Boldizsár I, Alberti Á. (2023) Vadgesztenye. Gyógyszerészet. 67(12): 654-663.

Valiyeva A, **Felegyi-Tóth CA**, Várnai B, Garaev E, Béni S, Kursinszki L. (2023) Characterization of alkaloid profile of *Hyoscyamus reticulatus* L. and *Atropa belladonna* subsp. *caucasica* (Kreyer) Avet by LC-MS and NMR. Nat Prod Res, 37(19):3357-3362.

Felegyi-Tóth CA, Tóth Z, Garádi Z, Boldizsár I, Nedves AN, Simon A, Felegyi K, Alberti Á, Riethmüller E. (2022) Membrane Permeability and Aqueous Stability Study of Linear and Cyclic Diarylheptanoids from *Corylus maxima*. Pharmaceutics. 14(6):1250.

Csepregi R, Temesfői V, Das S, Alberti Á, **Tóth CA**, Herczeg R, Papp N, Kőszegi T. (2020) Cytotoxic, Antimicrobial, Antioxidant Properties and Effects on Cell Migration of Phenolic Compounds of Selected Transylvanian Medicinal Plants. Antioxidants. 9(2):166.

7. Köszönetnyilvánítás

Legelőször is szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Alberti-Dér Ágnes** igazgató asszonynak az útmutatását és a bátorítását. Köszönettel tartozom a rengeteg időért és munkáért, amelyet szakmai fejlődésemre fordított. Különösen köszönöm neki a belém vetett bizalmat, amely során megtanított az önállóságra és hagyta, hogy megvalósítsam ötleteimet.

Szeretném megköszönni **Dr. Béni Szabolcs**nak, a Farmakognóziai Intézet korábbi igazgatójának, hogy lehetőséget adott, hogy részt vehessek a Tanszék életében.

Köszönet illeti a társszerzőket, **Garádi Zsófiát** és **Dr. Darcsi Andrást** az NMR analízisekért, **Dr. Riethmüller Esztert** és **dr. Simon Alexandrát** a PAMPA vizsgálatokért, **Dr. Boldizsár Imrét** a HR-MS mérésekért, **Dr. Csernák Orsolyát** a segítségéért, valamint **Dr. Bősze Szilviát** és **Stipsicz Bencét** a biológiai vizsgálatokért. Hálás vagyok a volt diákjaimnak, akikkel együtt dolgozhattam: **dr. Heilmann Tímeának** és **dr. Buda Eszternek**. Köszönöm **Dudás Bélának**, hogy biztosította a lajosházai kéreg mintákat a vizsgálatokhoz.

Köszönettel tartozom **Dr. Gampe Nórának**, hogy precízen és alaposan lektorálta az értekezést.

Köszönöm **Dr. Kursinszki Lászlónak** az értékes tanácsokat, **Dr. Zempléni-Tóth Anitának**, **dr. Vesztergombi Dánielnek** és **dr. Malcsiner Petrának** a segítséget és a közös munkát a HPLC-s méréseknél, **Nagyné Nedves Andreának** a technikai segítséget. Köszönöm a „**4. Labornak**”, különösen **Czeglédi Tamásnak**, illetve **Dr. Ványolós Attilának** és **Dr. Várnai Biankának** a segítségüket, az együtt töltött időt a laboratóriumon belül és kívül, valamint a tudományos és kevésbé tudományos beszélgetéseket.

Köszönet illeti a **Farmakognóziai Intézet valamennyi kollégáját**, különösen **Dr. Fejős Idát**, **Tóth Lenkét**, **Székely Ilonát** és **Kátai Lászlót** a segítségükért és támogatásukért. Hálás vagyok férjemnek, **dr. Felegyi Kristófnak**, akivel együtt tettük meg ezt az utat. Szeretném megköszönni kisfiam, **Boti** és **Kori** türelmét, **családom** és **barátaim** támogatását.