Növényi kivonatok hatóanyagainak azonosítása HPLC-vel kapcsolt tesztrendszerekkel: újszerű megközelítések a természetes anyagokból kiinduló gyógyszerkutatásban

Doktori tézisek

Könczöl Árpád
Richter Gedeon Nyrt., Szintézistámogató Laboratórium
Semmelweis Egyetem, Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Balogh György Tibor, c. egyetemi docens, Ph.D.
Konzulens: Dr. Kéry Ágnes, c. egyetemi tanár, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Kalász Huba, c. egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Csupor Dezső, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Tekes Kornélia, egyetemi tanár, Ph.D.
Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Lemberkovics Éva, egyetemi tanár, Ph.D.
Dr. Balla József, egyetemi docens, Ph.D.

Budapest, 2013

Bevezetés

Az anyatermészet mind történeti, mind statisztikai értelemben a humán gyógyászatban alkalmazható szerek leggazdagabb forrásának tekinthető: a jelenkor gyógyszerkincsének döntő hányadát természetes vagy természetes eredetű gyógyszermolekula adja. Ennek ellenére az elmúlt két évtizedben, a nagy áteresztőképességű szűrővizsgálatok (*high throughput screening*, HTS) és a párhuzamos szintézissel előállított vegyületkönyvtárak térhódításával egyidejűleg, a természetes anyagokból kiinduló gyógyszerkutatási stratégia fokozatosan háttérbe szorult az ipari gyakorlatban. E paradigmaváltás számos tudományos, illetve gazdasági tényezőre vezethető vissza. Az egyik legfontosabb érv azonban, amely a természetes anyagkeverékek (kivonatok) vizsgálatán alapuló kémiai kiindulópont keresés (*hit generation*) ellen szól, hogy az nehezen harmonizálható a modern HTS-alapú megközelítéssel: az adott bioassay, az elválasztástechnikai és szerkezetazonosítási lépések szekvenciális, iteratív alkalmazása szükségszerűen egy inherensen lassú munkafolyamatot eredményez. A dereplikáció megvalósítása, azaz a már leírt vegyületek „újraizolálásának" elkerülése további kihívásként jelentkezik.

A fentiekben vázolt problémakör hatékony megoldását a három kritikus részlépést, azaz a komplex keverék felbontását, a komponensek aktivitásának megbízható detektálását, és végül az egyes hatóanyagok gyors dereplikációját szinergikusan ötvöző, úgynevezett kapcsolt vagy „profilírozó" analitikai megközelítések jelenthetik. A vizsgált biológiai jelenség (pl.: enzimgátlás, receptor kötődés, szabadgyök-fogó képesség) és a kapcsolás módjának (at-line, off-line, on-line) függvényében számos, különböző elnevezésű innovatív módszer terjedt el a gyógyszerkutatási gyakorlatban. Ki kell azonban emelni, hogy az elválasztástechnológia és a nagyműszeres analitika elmúlt években végbement ugrásszerű fejlődése is elengedhetetlen volt a terület kialakulásához. Robusztus ionforrások, illetve ultra-nagy hatékonyság elérésére alkalmas kromatográfiás állófázisok és készülékek megjelenésével, a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriai rendszerek (HPLC-MS) mind

felbontóképességben, mind gyorsaságban új dimenziót nyitottak a természetes anyagkeverékek elemzésében. Emellett a mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) érzékenységének drámai javulása, és az egyre gazdagabb specifikus kémiai és biológiai háttéradatbázisok is jelentős mértékben hozzájárultak a dereplikációs folyamatok hatékonyságnövekedéséhez.

Doktori munkám két különálló, ám terápiás szempontból kiemelten fontos, természetes anyagok kutatásával foglalkozó terület fentiekben részletezett megközelítés szerinti metodikai fejlesztésére irányult. Egyrészt, növényi kivonatok antioxidáns hatású komponenseinek azonosítása céljából szabadgyök-fogó képesség mérésére szolgáló *in vitro* teszteket off-line módon kapcsoltunk HPLC módszerekkel. Másrészt, hogy a központi idegrendszert célzó korai fázisú gyógyszerkutatás számára elérhetőbbé tegyük a természetes anyagcseretermékeket, a vér-agy gát permeabilitás mérésére szolgáló PAMPA-BBB tesztrendszer természetes anyagokon, illetve növényi kivonatokon való alkalmazhatóságát vizsgáltuk.

Célkitűzések

Elsődleges célunk a Richter Gedeon Nyrt. molekulabankjában található növényi kivonatgyűjtemény (N=4400) szűrővizsgálatainak megtervezése, adoptálása, validálása és kivitelezése volt. Ennek keretében citotoxikus hatásra, antioxidáns hatásra (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil gyök, DPPH), illetve vér-agy gát permeabilitásra irányuló szűrővizsgálatokat terveztünk. Mivel az utóbbi két vizsgálatban találatként azonosított minták növényi anyagcseretermékek komplex keverékeinek bizonyultak, megkíséreltük az egyes biológiai tesztrendszerek (bioassay) HPLC módszerekkel történő összekapcsolását. Ennek során arra törekedtünk, hogy az egyes hatóanyagok bioassay alapú azonosításának, dereplikációjának és izolálásának útját lerövidítsük, hatékonyabbá tegyük. Ezen felül, a találatokhoz kapcsolódó esettanulmányainkban, az egyes vizsgált növényfajok fitokémiai és farmakológiai jellemzéséhez is hozzá kívántunk járulni.

A kísérletes munkában célunk volt:

1. A kivonatgyűjtemény citotoxikus és antioxidáns hatásra irányuló szűrése, majd a szűrővizsgálat eredményeinek értelmezése a kivonatok, illetve extraháló oldószereik polaritásának függvényében.

2.a. A szűrővizsgálatokban fokozott antioxidáns hatású, de citotoxicitást nem mutató növényi kivonatok (találatok) LC-MS technikával való elemzése, rangsorolása és dereplikációja, továbbá egy DPPH teszttel összekapcsolt LC-MS módszer fejlesztése, oly módon, hogy a kapcsolt módszer hatékonyabbá tegye egy antioxidáns kivonat (*Artemisia gmelinii*) szabadgyök-fogó képességgel bíró komponenseinek azonosítását.

2.b. E megközelítés szerint az *A. gmelinii* kivonat antioxidáns hatásáért felelős komponenseinek azonosítása, majd a legaktívabbak izolálása és szerkezetük meghatározása.

3.a. A pirogallol vörös színkioltásán alapuló, peroxinitrit ($ONOO^-$) semlegesítést mérő kolorimetriás teszt HPLC-re való átültetése, alkoholos *Salvia* (zsálya) kivonatok és komponenseik szabadgyök-fogó sajátságának hatékony vizsgálatához.

3.b. A kialakított HPLC-alapú $ONOO^-$ semlegesítést mérő módszer teljesítőképességének bemutatása a *Salvia miltiorrhiza* Bunge (kínai zsálya) metanolos kivonatának példáján keresztül.

4.a. A vér-agy gát permeabilitás mérésére szolgáló *in vitro* PAMPA-BBB tesztrendszer természetes anyagokon, illetve növényi kivonatokon történő alkalmazhatóságának vizsgálata, továbbá a kivonatgyűjtemény szűrővizsgálatával megfelelő agyi penetrációval bíró komponensek azonosítása.

4.b. A PAMPA-BBB tesztrendszer NMR vizsgálatokkal való direkt összekapcsolásának megvalósítása, majd a szűrővizsgálatban találatként azonosított 4 db kivonat példáján (*Tanacetum parthenium* (őszi margitvirág), *Vinca major* (nagy meténg), *Salvia officinalis* (orvosi zsálya), *Corydalis cava* (odvas keltike)) e kapcsolt analitikai módszer teljesítőképességének bemutatása.

Anyagok és módszerek

Vizsgált növényi minták

A Richter Gedeon Nyrt. növényi kivonatgyűjteménye vezető magyarországi botanikai, farmakognóziai és gyógynövénykutató intézetekkel (Vácrátót, Budapest, Szeged, Budakalász) kötött szerződéses együttműködés keretében került kialakításra 1999 és 2001 között. Az együttműködés 4400 db random gyűjtött egyedi kivonatot eredményezett, amely kb. 300 db a Kárpát-medencében őshonos vagy termeszthető növényfaj kb. 500 db drogjából készült el. Az oldószeres extrakció függvényében, a gyűjtemény apoláros alkönyvtárát a kloroformos, esetenként petrol-éteres kivonatolással nyert minták (N=1996), míg a vizes-alkoholos extraktumok a gyűjtemény poláros hányadát (N=2404) adták.

Esettanulmányok keretében a következő kivonatok kerültek részletes jellemzésre:

- HPLC-vel off-line kapcsolt DPPH teszt: *Artemisia gmelinii* Webb. ex Stechm. (Asteraceae): herba, Vácrátót, nyers apoláros ($CHCl_3$-MeOH 9:1) és poláros kivonatok (70% MeOH), szilika gélen frakcionálva.
- HPLC-vel off-line kapcsolt $ONOO^-$ teszt: *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Lamiaceae): herba, Vácrátót, nyers poláros kivonat (70% MeOH).
- Vér-agy gát permeabilitási vizsgálatok PAMPA-BBB teszttel: *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip. (Asteraceae), herba, Debrecen, hideg CH_2Cl_2-MeOH (9:1) elegyével készült kivonat;
  Corydalis cava Schweig. & Kört. (Papaveraceae), gumós gyökér, Dobogókő, előtisztított gyengén bázikus alkaloid frakció;
  Salvia officinalis L. (Lamiaceae), levél, Vácrátót, nyers poláros kivonat (70% MeOH), poliamid gélen frakcionálva;
  Vinca major L. (Apocynaceae), herba, Vácrátót, nyers apoláros ($CHCl_3$-MeOH 9:1) és poláros kivonatok (70% MeOH), szilika gélen frakcionálva.

Műszeres analitikai módszerek

HPLC-MS: Minden vizsgálatot egy Agilent 1200-as folyadékkromatográfiás rendszeren végeztünk, amelyhez egy elektroporlasztásos ionforrással (ESI) szerelt Agilent 6410-es hármas kvadrupól tömegspektrométer (QQQ-MS) kapcsolódott. Adatgyűjtésre, a mennyiségi és minőségi kiértékeléshez a MassHunter B.04.01 szoftvercsomagot használtuk. A mérések 40 °C hőmérsékleten Ascentis Express C_{18} kolonnán (50 × 3.0 mm, 2.7 µm) optimált gradiens elúciós üzemmódokban történtek.

NMR: Az NMR méréseket egy háromcsatornás ($^{1}H\{^{13}C/^{15}N\}$), ^{13}C érzékenységnövelt, hűtött mérőfejjel felszerelt 800 MHz-es Varian készülékkel végeztük, 800 illetve 201 MHz-en használva a ^{1}H és ^{13}C spektrumok felvételekor. A pulzusprogramokat a VNMRJ-3.1 és 3.2 szoftverek pulzuskönyvtárából, módosítás nélkül alkalmaztuk.

Citototoxicitás szűrővizsgálat

A teljes kivonatgyűjtemény citotoxikus hatásra irányuló vizsgálatában a rezazurin redukálásán alapuló fluoreszcens detektálású tesztet (Promega) használtuk CHO (immortalized chinese hamster ovarian cell line) sejtvonalon. A meghatározás elve, hogy az élő sejtek enzimrendszerük révén redox reakcióban fluoreszcens rezorufinná képesek alakítani a festékanyag rezazurint. A kivonatokat 400 µg/ml koncentrációban 1% DMSO tartalom mellett szűrtük. A 20% feletti hatást (sejtpusztulást) mutató mintákat minősítettük toxikusnak.

Antioxidáns szűrővizsgálat

A teljes kivonatgyűjtemény antioxidáns hatásra irányuló vizsgálatát a DPPH teszt mikroplate formátumú változata szerint, spektrofotometriás detektálás mellett végeztük el. Az egységesen 66,7 µg/ml koncentrációjú minták DPPH gyök 60 µM-os etanolos oldatával való inkubálása 30 percen át szobahőmérsékleten történt. A 80%-os gátlás értéket meghaladó kivonatokat minősítettük elsődleges találatoknak. Ezen minták IC_{50} értékét egy további kísérletsorozatban határoztuk meg.

HPLC-vel off-line kapcsolt DPPH tesztrendszer

Az *A. gmelinii* metanolos kivonatának, illetve komponenseinek szabadgyök-fogó aktivitását a Tang és mtsai. (2008) által kidolgozott spike-olásos módszer alapján jellemeztük. A kivonat 0,5 ml DMSO törzsoldatát és a DPPH gyök 0,5 ml 1,5 mM-os etanolos oldatát alaposan összekevertük, majd 30 percig hagytuk reagálni. Ezután a reakcióelegyet szűrtük és a kivonatra optimált HPLC-MS módszerrel vizsgáltuk. A negatív kontrolminta tiszta etanol hozzáadásával készült. Végül az így kapott kromatogramok összehasonlítása alapján, a két legaktívabb komponenst célzott preparatív HPLC-vel izoláltuk, majd szerkezetüket HRMS és NMR mérésekkel határoztuk meg.

HPLC-vel off-line kapcsolt peroxinitrit ($ONOO^-$) tesztrendszer

A pirogallol vörös színkioltásán alapuló, $ONOO^-$ semlegesítését mérő teszt HPLC-re való átültetését egy, *Salvia* fajok alkoholos kivonatait leképező fenolos modell elegy (N=17, komponensenként 600 µM) részletes vizsgálatával valósítottuk meg. A pirogallol vörösnek, a teszt szubsztrát-vegyületének szelektív detektálását a HPLC-s módszer finomhangolásával értük el. Ennek során az eluens kémhatását (pH=1.90), az injektált térfogatot (6 µl) és a detektálás hullámhosszát (470 nm) optimáltuk. A modell elegy fenolos komponenseinek degradációs kinetikáját növekvő $ONOO^-$ koncentrációk (0,5-10,0 mM) mellett vettük fel, majd a komponensek egyedi gyökfogó képességeivel (IC_{50}) hasonlítottuk össze. Végül a kialakított tesztrendszer teljesítőképességét a *S. miltiorrhiza* metanolos kivonatának példáján demonstráltuk.

Vér-agy gát permeabilitási tesztrendszer és kapcsolódó módszerek

A PAMPA-BBB mérések standardizált protokoll szerint történtek: a Millipore 96-lyukú „szendvics plate” rendszerét, a donor és a fogadó oldalon egyaránt 0,01 M-os foszfát puffert (PBS, pH=7,4), vér-agy gát specifikus modellmembránként dodekánban oldott sertés agyi lipid homogenizátumot használtunk, a rendszer inkubációja 37 °C-on, 4 órán át történt. A PAMPA-

BBB teszt prediktív erejének validálása 23 db természetes és 20 db természetes anyagra visszavezethető gyógyszervegyület effektív permeabilitási értékének (P_e, cm/s) meghatározásával, majd *in vivo* logBB értékével való összehasonlítás alapján történt. A kivonatgyűjtemény citotoxikus hatást nem mutató alkönyvtárának (N=1760) szűrővizsgálata szintén a standard protokoll szerint történt: 1,0 mg/ml kivonat koncentráció, 10% donor oldali DMSO koszolvens tartalom, és spektrofotometriás kiolvasás (240-400 nm) alkalmazásával. A szűrővizsgálatban találatként azonosított (BBB+) 4 kivonat (*T. parthenium*, *V. major*, *S. officinalis*, *C. cava*) esetén deuterált PBS pufferben, emelt kivonat koncentráció (50 mg/ml) és 10% koszolvens alkalmazása mellett megismételtük a PAMPA-BBB kísérleteket. Az így nyert fogadó oldali oldatokból 1-1 ml-t direkt NMR méréseknek vetettünk alá.

A referencia vegyületek és a természetes eredetű gyógyszermolekulák PAMPA-BBB oldatokban való mennyiségi meghatározása, továbbá a találatok (BBB+) dereplikációja, kromatográfiás retenciós tényező és móltömeg szerinti jellemzése optimalizált LC-MS módszerekkel történt. A PAMPA-BBB szűrésből származó fogadó oldali oldatok koszolvens (DMSO, MeOH) tartalmát gázkromatográfiás-lángionizációs detektorral határoztuk meg.

Eredmények és megbeszélésük

1. A növényi kivonatgyűjtemény mind citotoxicitás, mind antioxidáns szűrővizsgálatai validnak és sikeresnek bizonyultak. A gyűjtemény több mint fele (57%) mutatott citotoxikus aktivitást, míg fokozott antioxidáns hatást csak a minták 5,7%-a adott. Kimutattuk továbbá, hogy a kivonatok extrakciós eljárása mindkét paraméterre nézve jelentős, de egymással ellentétes hatást gyakorolt: a kloroformmal extrahált minták esetén kétszer nagyobb valószínűséggel jelentkezett citotoxicitás a metanolos kivonatokhoz hasonlítva, míg a szabadgyök-fogó aktivitás jellemzően a metanolos kivonatokhoz volt köthető.
2. Ezek után, egy szabadgyök-fogó hatást mutató találat, az *A. gmelinii* metanolos kivonatának antioxidáns hatás alapú fitokémiai vizsgálatát valósítottuk meg DPPH- HPLC tesztrendszerrel.

   Új metodikai eredmények: sikeresen alkalmaztuk a DPPH teszt folyadékkromatográfiával való off-line kapcsolását a vizsgált keverék szabadgyök-fogó komponenseinek gyors és megbízható azonosítására. Mindez kulcsfontosságúnak bizonyult, hiszen 6 db major komponens LC-MS-sel való dereplikációját követően, a preparatív HPLC-s izolálást már célzottan csak a két legaktívabb komponens (3,5-*O*-dikaffeoil-kínasav és 3,5-*O*-dikaffeoil-etilkinát) esetén kellett elvégezni. Meg kell azonban jegyezni, hogy a két dikaffeoil-kínasav (DCQA) szerkezetének meghatározása a vonatkozó spektroszkópiai irodalom ellentmondásai miatt különösen nehéz feladatnak bizonyult.

   Új fitokémiai és farmakológiai eredmények: A 8 db azonosított komponensből 6-ot, nevezetesen a klorogénsavat, a 4-*O*-kaffeoil-kínasavat, luteolin-7-*O*-glükozidot, az apigenin-7-*O*-glükozidot és a két izolált dikaffeoil-kínasav származékot elsőként írtuk le az *A. gmelinii*-ben. Ezenfelül, az articsóka fő, hepatoprotektív hatóanyagaival való nagyfokú fitokémiai hasonlóságot alapul véve, arra a következtetésre jutottunk, hogy az azonosított fenilpropán és flavonoid komponensek fokozott antioxidáns hatásuknál fogva, magyarázzák és alátámasztják az

A. gmelinii májgyulladásos kórképekben történő népgyógyászati alkalmazását.

3. Ezt követően az off-line kapcsolás koncepcióját egy másik szabad-gyök esetén is megvalósítottuk. A pirogallol vörös színkioltásán alapuló, $ONOO^-$ semlegesítését mérő tesztet sikeresen ültettük át HPLC-re.

   Új metodikai eredmények: Részletes validálási vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy komplex keverékek szabadgyök-fogó képességgel rendelkező komponenseinek kromatográfiás csúcsterületei szignifikánsan és arányosan csökkenek a peroxinitrit anionnal való reakció hatására. Egy tesztvegyület, a karnozol aspecifikus degradációja azonban rámutatott a megközelítés törvényszerű korlátjára. Összességében, a kialakított tesztrendszer révén lehetővé vált *Salvia* (zsálya) fajok alkoholos kivonatainak fitokémiai és $ONOO^-$ semlegesítő aktivitási profiljainak egyidejű, megbízható és gyors elemzése.

   Új fitokémiai és farmakológiai eredmények: A *Salvia* nemzetségre jellemző, 17 db fenolos marker vegyület $ONOO^-$ semlegesítő aktivitásának részletes vizsgálata során, a galluszsav, a kávésav, a rozmaringsav, a salvianol sav A és B, a kvercetin, és a kempferol kimagaslóan jó hatást mutatott a $ONOO^-$ anionnal szemben. Ezen felül, a kialakított tesztrendszer *S. militiorrhiza* (kínai zsálya) metanolos kivonatán történő alkalmazása rávilágított, hogy e széles körben használt gyógynövény jelentős $ONOO^-$ semlegesítő aktivitásáért annak fenilpropán alkotói felelősek elsődlegesen.

4. Munkánk második felében a vér-agy gát permeabilitás mérésére szolgáló PAMPA-BBB tesztrendszer természetes anyagokon, illetve növényi kivonatokon történő alkalmazhatóságát vizsgáltuk.

   Új metodikai eredmények: Azt találtuk, hogy a PAMPA-BBB teszt természetes anyagok esetén is megőrzi prediktív erejét, továbbá egyedi és jelentős szelektivitást mutat fitokémiai értelemben. E funkcióját kihasználva alkalmasnak bizonyult központi idegrendszerbe nagy valószínűséggel bejutni képes komponensek növényi kivonatokból való kiszűrésére/azonosítására. Ezen felül, a PAMPA-BBB teszt *in vitro*

jellegének és egyszerű modell-mechanizmusának (passzív diffuzió) kiaknázásával elértük, hogy néhány tesztkörülmény módosításával (sokkomponensű kivonatokat megemelt dózisban, deuterált pufferben vizsgálva) a PAMPA-BBB tesztből származó fogadó oldali szűrletminták NMR és LC-MS méréssel történő dereplikációja közvetlenül (at-line) kivitelezhetővé vált. Meglátásunk szerint a kialakított PAMPA-BBB/LC-MS/NMR kaszkád alkalmas és érdemes, a természetes anyagokból kiinduló, HTS-alapú központi idegrendszeri gyógyszerkutatásba történő bevezetésre.

Új fitokémiai és farmakológiai eredmények: Az egyes, fő fitokémiai vegyületcsaládok effektív permeabilitásának vizsgálatával igazoltuk, hogy a gyógyszerhatóanyagok felszívódására vonatkozó alapvető koncepcióknak megfelelően, a glikozidos és szabad karbonsav funkciót tartalmazó molekulák praktikusan képtelenek a lipid kettősrétegen való átjutásra, míg a flavonoidok (aglikonként), alkaloidok, terpének és kumarinok képviselői közepes vagy fokozott vér-agy gát permeabilitási képességgel bírnak. Ezen felül, a kísérletes munkánk fontos *in vitro* adatokat szolgáltatott az esettanulmányokban vizsgált növények (*T. parthenium, V. major, S. officinalis, C. cava*) farmakológiailag aktív komponenseinek agyi penetrációs készségére vonatkozólag.

Következtetések

Az alapvetően HTS-alapú kémiai kiindulópont keresés miatt napjainkban a gyógyszerkutatás egyre gyorsuló ütemben zajlik. Annak érdekében, hogy a természetes anyagokból kiinduló vezérmolekula-azonosítás képes legyen megfelelni az ipari környezet elvárásainak, számtalan, e stratégiát innovatív úton javítani és felgyorsítani hivatott módszer és technika jelent meg és terjedt el. Ezek közül, a komplex természetes anyagkeverékek kémiai és biológiai profilírozására alkalmazott HPLC-vel kapcsolt tesztrendszerekben mutatkozik lehetőség, hogy jelentősen növeljék az időigényes bioaktivitás-alapú frakcionálási eljárások hatékonyságát vagy esetlegesen ki is váltsák azokat. Bizonyos műszerezettségi kérdések mellett e HPLC-alapú tesztrendszerek kialakításának lényege és egyúttal legnagyobb kihívása, hogy a biológiai adatok kémiai-analitikai információkkal való összecsatolása valid és hatékony úton történjen meg.

A disszertációban bemutatott HPLC-alapú tesztrendszerek segítségével elért felbontás és multidimenzionális információtartalom alapján úgy véljük, hogy a modern spektroszkópiai és elválasztástechnikák robusztus biológiai szűrővizsgálatokkal történő házasítása a természetes anyagokból kiinduló vezérmolekula-azonosítás egy járható és hathatós útját eredményezi. Ezen túlmenően, a kialakított profilírozó tesztrendszerek kiválóan alkalmazhatóak lehetnek gyógynövények és gyógynövénykészítmények minőségi, hatásossági vagy akár biztonságossági vizsgálatára is. Végezetül hisszük, hogy ezen újszerű megközelítések fokozatosan meg fognak honosodni a nagyipari gyógyszerkutatásban is.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Könczöl Á, Kéry Á, Keserű GM, Balogh GT. (2010) LC determination of peroxynitrite scavenging activity of phenols from *Salvia* spp. Chromatographia, 71(S1): 51-59. IF: 1.075

Balogh GT, **Könczöl Á**. (2011) Plant extracts in drug discovery: Traditional considerations, novel chances [Növényi extraktumok az eredeti gyógyszerkutatásban: Tradicionális érvek, új lehetőségek]. Acta Pharm Hung, 81: 5-17. IF:-

Könczöl Á, Béni Z, Sipos MM, Rill A, Háda V, Hohmann J, Máthé I, Szántay C, Keserű GM, Balogh GT. (2012) Antioxidant activity-guided phytochemical investigation of *Artemisia gmelinii* Webb. ex Stechm.: Isolation and spectroscopic challenges of 3,5-*O*-dicaffeoyl (epi?) quinic acid and its ethyl ester. J Pharm Biom Anal, 59: 83-89. IF: 2.967

Könczöl Á, Müller J, Földes E, Béni Z, Végh K, Kéry Á, Balogh GT. (2013) Applicability of a Blood-Brain Barrier Specific Artificial Membrane Permeability Assay at the Early Stage of Natural Product-Based CNS Drug Discovery. J Nat Prod, 76: 655-663. IF: 3.128

Balogh GT, **Könczöl Á**. Növényi eredetű hatóanyagok helye és szerepe az eredeti gyógyszerkutatásban (chapter IV.1.1.) In: Balázs A, Blázovics A, Kéry Á, Kursinszki L, Lemberkovics É, Szőke É, Then M, Farmakognózia – Fitokémia. Gyógynövények alkalmazása. Szőke É. (ed.) (2013) ISBN 978-963-9129-87-0.

Egyéb közlemények

Könczöl Á. (2004) Glükózaminoglikánok antioxidáns hatásának összehasonlító vizsgálata [Comparative study of the antioxidative effect of glycosaminoglycanes]. Period Polytech Chem Eng, 48:137.

Balogh GT, Vukics K, **Könczöl Á**, Kis-Varga Á, Gere A, Fischer J. (2005) Nitrone derivatives of trolox as neuroprotective agents. Bioorg Med Chem Lett, 15: 3012-3015. IF: 2.478

Kiss R, Kiss B, **Könczöl Á**, Szalai F, Jelinek I, László V, Noszál B, Falus A, Keseru GM. (2008) Discovery of novel human histamine H4 receptor ligands by large-scale structure-based virtual screening. J Med Chem 51: 3145-3153. IF: 4.898

Balogh GT, **Könczöl Á**, Sándor M. (2011) Új megoldások az eredeti gyógyszerkutatás szintézistámogató analitikájában. Magyar Kémikusok Lapja LXVI évf. 12: 378-382.

Balogh GT, Müller J, **Könczöl Á**. (2013) pH-gradient PAMPA-based *in vitro* model assay for drug-induced phospholipidosis in early stage of drug discovery. Eur J Pharm Sci 49: 81-89. IF: 3.212

Köszönetnyilvánítás

Legelőször is témavezetőmnek, **Dr. Balogh György Tibornak** szeretném kifejezni legmélyebb hálámat kitartó szakmai és emberi támogatásáért. Az elmúlt évek során nagyon erős barátság szövődött köztünk. Köszönöm "Darth Plagueis"!

Köszönettel tartozom konzulensemnek, **Kéry Ágnes professzorasszonynak**, hogy beavatott a farmakognózia és a fitoterápia szépségeibe. Konzultációink mindig nagyon ösztönzőleg hatottak szakmai gondolkodásomra.

Köszönöm a Richter Gedeon Nyrt. originális kutatási vezetőinek, **Prof. Keserű György Miklós** főosztályvezető helyettes és **Dr. Greiner István** igazgató uraknak, hogy lehetővé tették számomra, hogy rutinfeladataim mellett kutatómunkát is végezhessek.

Külön köszönöm kollégáim támogatását: **Dr. Béni Zoltánnak** a kiváló NMR méréseket és az inspiráló beszélgetéseket, **Meszlényiné Sipos Mártának**, hogy bevezetett a HPLC világába, **Dr. Rill Attilának** a preparatív HPLC-s munkát, **Dr. Háda Viktornak** a HRMS méréseket, **Dr. Visegrády Andrásnak** a citotoxicitás szűrővizsgálat kivitelezését, **Huszárné Török Zsuzsának**, **Csomontányi Józsefné Marikának**, és **Gyulai Zsuzsannának** a labormunkában nyújtott segítségét, **Müller Judit** Ph.D. hallgatónak a PAMPA méréseket, és **Kiss Lászlónak** a kézirat angol lektorálását.

Prof. Szőke Évának, **Prof. Lemberkovics Évának**, **Dr. Alberti Ágnesnek**, **Dr. Engel Ritának**, **Prof. Hohmann Juditnak** és **Prof. Máthé Imrének** az egyes botanikai és fitokémiai együttműködésekért szeretnék köszönetet mondani.

Végezetül minden családtagomnak, de különösen szüleimnek, feleségemnek és húgomnak köszönöm mindazt a szeretetet és türelmet, amely biztosította, hogy idáig eljuthassak.

Drága Mamám, a Neked tett ígéret nélkül ez a munka soha nem készült volna el. A disszertációt emlékednek ajánlom.