# FONALAS GOMBÁK MÁSODLAGOSMETABOLIT-TERMELÉSÉNEK TANULMÁNYOZÁSA

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**BENCSIK OTTÓ**

**TÉMAVEZETŐK:**

**DR. PAPP TAMÁS, EGYETEMI DOCENS**

**DR. SZEKERES ANDRÁS, TUDOMÁNYOS FŐMUNKATÁRS**

**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM**

**TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR**

**MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

**2017**

**SZEGED**

# Tartalomjegyzék

**1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE ..... 5**

**2 BEVEZETÉS ..... 8**

**3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS ..... 10**

3.1 A *BIPOLARIS* NEMZETSÉG JELLEMZÉSE ..... 10

3.2 AZ OPHIOBOLINOK KÉMIÁJA ..... 12

*3.2.1 Az ophiobolinok bioszintézise, kémiai szerkezete, csoportosítása ..... 12*

*3.2.2 Az ophiobolintermelés és a vegyület stabilitása ..... 16*

*3.2.3 Az ophiobolinok tisztítása ..... 17*

3.3 AZ OPHIOBOLINOK BIOLÓGIAI HATÁSA ..... 21

*3.3.1 Az ophiobolinok fitotoxikus hatása ..... 21*

*3.3.2 Az OPA kalmodulingátló hatása ..... 23*

*3.3.3 Az ophiobolinok antimikrobiális hatása ..... 23*

*3.3.4 Az ophiobolinok nematocid hatása ..... 24*

*3.3.5 Az ophiobolinok citotoxikus hatása ..... 25*

*3.3.6 Az ophiobolinok HIV-1 integráz antagonista hatása ..... 27*

*3.3.7 Az ophiobolinok in vivo hatásai ..... 27*

*3.3.8 Az ophiobolinok hatása hímivarsejteken ..... 28*

**4 CÉLKITŰZÉSEK ..... 29**

**5 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK ..... 30**

5.1 FELHASZNÁLT ANYAGOK ..... 30

5.2 A VIZSGÁLT IZOLÁTUMOK ..... 31

5.3 TENYÉSZTÉSI KÖRÜLMÉNYEK ..... 32

5.4 OPHIOBOLIN KIVONÁS ..... 33

5.5 OPHIOBOLINOK ANALITIKAI HPLC VIZSGÁLATA ..... 33

*5.5.1 Az OPA termelésének vizsgálatára alkalmazott HPLC módszer ..... 33*

*5.5.2 Az ophiobolintermelés optimalizálására alkalmazott HPLC módszer ..... 34*

*5.5.3 Az OPA bomlásának vizsgálatára alkalmazott HPLC módszer ..... 34*

*5.5.4 Az O1 sarzsból nyert frakciók tisztaságának vizsgálatára alkalmazott HPLC módszer ..... 35*

*5.5.5 Az O2, O3, O4 sarzsokból nyert frakciók tisztaságának vizsgálatára alkalmazott HPLC módszer 35*

5.6 AZ OPHIOBOLIN MOLEKULÁK TISZTÍTÁSA ..... 35

*5.6.1 Az O1 sarzs félpreparatív tisztítása ..... 35*

5.6.1.1 A normál fázisú félpreparatív HPLC tisztítás ..... 35

5.6.1.2 A fordított fázisú félpreparatív HPLC tisztítás ..... 36

*5.6.2 Az O2, O3 és O4 sarzsok félpreparatív tisztítása ... 36*
5.7 AZONOSÍTÁS, SZERKEZETVIZSGÁLAT ... 37
*5.7.1 Ophiobolin származékok molekulatömegének tömegspektrometriás meghatározása ... 37*
*5.7.2 NMR mérések ... 38*
5.8 AZ OPA STABILITÁSÁNAK VIZSGÁLATA ... 38
5.9 BIOLÓGIAI HATÁSVIZSGÁLATOK ... 38
*5.9.1 Hímivarsejt mozgékonyság gátlás vizsgálata ... 38*
*5.9.2 Hímivarsejt mozgékonyság gátlás vizsgálat validálása ... 39*
*5.9.3 Sejtmembrán-permeabilitási vizsgálat ... 40*
*5.9.4 A mitokondriumdepolarizációs hatás vizsgálata ... 41*
*5.9.5 Emlős szomatikus sejt citotoxicitás vizsgálat ... 41*
5.10 SZÁMÍTÁSI MÓDSZEREK, STATISZTIKAI ELEMZÉSEK ... 42
*5.10.1 Kromatográfiás paraméterek meghatározása ... 42*
5.10.1.1 Rendszeralkalmasság ... 42
5.10.1.2 Linearitás ... 43
5.10.1.3 Rendszerpontosság ... 43
*5.10.2 A félpreparatív tisztítások során alkalmazott kalkulációk ... 43*
5.10.2.1 Tisztaság ... 43
*5.10.3 A tenyésztési körülmények optimalizálásának statisztikai elemzései ... 44*
*5.10.4 Biológiai hatásvizsgálatok statisztikai elemzései ... 44*

**6 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS ... 45**

6.1 KROMATOGRÁFIÁS PARAMÉTEREK MEGHATÁROZÁSA ... 45
6.2 OPHIOBOLINOK TERMELÉSI KINETIKÁJA ... 46
6.3 OPHIOBOLINOK FÉLPREPARATÍV TISZTÍTÁSA AZ O1 SARZSBÓL ... 49
*6.3.1 Normál fázisú tisztítás ... 49*
*6.3.2 Fordított fázisú tisztítás ... 49*
6.4 A TISZTÍTOTT MINTÁK TOVÁBBI VIZSGÁLATAI ... 54
*6.4.1 Tömegspektrometriás vizsgálatok ... 54*
*6.4.2 NMR vizsgálatok ... 58*
6.5 OPHIOBOLINOK FÉLPREPARATÍV TISZTÍTÁSA AZ O2, O3 ÉS O4 SARZSBÓL ... 59
6.6 AZ O2, O3 ÉS O4 SARZSBÓL TISZTÍTOTT VEGYÜLETEK TOVÁBBI VIZSGÁLATAI ... 75
*6.6.1 Tömegspektrometriás vizsgálatok ... 75*
*6.6.2 NMR vizsgálatok ... 79*
6.7 TENYÉSZTÉSI KÖRÜLMÉNYEK OPTIMALIZÁLÁSA ... 80
*6.7.1 Konídiumszuszpenzióval történő leoltás ... 80*
*6.7.2 Agardugóval történő leoltás ... 82*
*6.7.3 Tenyésztési hőmérséklet hatása az ophiobolintermelésre ... 84*

*6.7.4 Szénforrás optimalizálása ... 88*

6.8 AZ OPA STABILITÁSA SZERVES OLDÓSZEREKBEN ... 91

6.9 OPHIOBOLINOK BIOLÓGIAI AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA ... 100

*6.9.1 Az ophiobolinok hímivarsejtek mozgékonyságára kifejtett hatása ... 100*

*6.9.2 Az ophiobolinok hatása a plazmamembrán-polarizációjára ... 100*

*6.9.3 Az ophiobolinok hatása a mitokondriummembrán polarizációjára ... 101*

*6.9.4 Az ophiobolinok hatása tumoros sejtvonalakon ... 105*

**7 ÖSSZEFOGLALÁS ... 108**

**8 SUMMARY ... 113**

**9 IRODALOMJEGYZÉK ... 118**

**10 MELLÉKLETEK ... 128**

# 1 Rövidítések jegyzéke

3-a-6-OH-OPA: 3-anhidro-6-hidroxi-ophiobolin A

3-a-6-e-OPA: 3-anhidro-6-*epi*-ophiobolin A

3-a-OPA: 3-anhidro-ophiobolin A

6-e-OPA: 6-*epi*-ophiobolin A

6-e-OPC: 6-*epi*-ophiobolin C

6-e-OPG: 6-*epi*-ophiobolin G

6-e-OPM: 6-*epi*-ophiobolin M

6-e-OPN: 6-*epi*-ophiobolin N

8-e-OPJ: 8-*epi*-ophiobolin J

25-OH-OPI: 25-hidroxi-ophiobolin I

A-549: Adenocarcinomic Human Alveolar Basal Epithelial Cell Line - humán alveoláris epitélsejt eredetű adenokarcinóma sejtvonal

B16F10: Mouse Skin Melanoma Cell Line – egér melanóma sejtvonal

BRIP: Queensland Plant Pathology Herbarium

CAM: Calcein-Acetoxymethyl Ester – kalcein-acetoxi-metilészter

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures

CLL: Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Line - Krónikus limfocitás leukémia sejtvonal

DMAPP: Dimetilallil-pirofoszfát

DMSO: Dimetil-szulfoxid

EtOAc: Etil-acetát

EtOH: Etil-alkohol

FPP: Farnezil-pirofoszfát

GFPP: Geranilfarnezil-pirofoszfát

GGPP: geranilgeranil-pirofoszfát

GPP: Geranil-pirofoszfát

HCT116: Human Colorectal Carcinoma Cell Line – humán vastagbélrák sejtvonal

HepG2: Hepatocellular Carcinoma Cell Line – humán máj karcinóma sejtvonal

HPLC: High Performance Liquid Chromatography – Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

Hs683: Human Glioma Cell Line – humán glióma sejtvonal

IPA: Izopropil-alkohol

IPP: Izopentenil-pirofoszfát

JC-1: 5,5’,6,6’-tetrakloro-1,1’,3,3’-tetraetil-benzimidazolo-karbocianin jodid

K562: Human Erythroleukemic Cell Line – humán eritroleukémia sejtvonal

L1210: Mouse Leukemia Cell Line – egér leukémia sejtvonal

MeCN: acetonitril

MEM: Minimum Essential Medium – minimum esszenciális tápfolyadék

MeOD: Metanol-$d_4$

MeOH: Metil-alkohol

MCF-7: Human Breast Adenocarcinoma Cell Line – humán emlő adenokarcinóma sejtvonal

MS: Mass Spectrometry - tömegspektrometria

NP-HPLC: Normal Phase High Performance Liquid Chromatography – Normál fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

NRRL: Agricultural Research Service Culture Collection

OPA: Ophiobolin A

OPA-lakton: Ophiobolin A lakton

OPB: Ophiobolin B

OPC: Ophiobolin C

OPH: Ophiobolin H

OPI: Ophiobolin I

OPJ: Ophiobolin J

OPK: Ophiobolin K

OPL: Ophiobolin L

OPM: Ophiobolin M

OPN: Ophiobolin N

OPO: Ophiobolin O

OPP: Ophiobolin P

OPQ: Ophiobolin Q

OPR: Ophiobolin R

OPS: Ophiobolin S

OPT: Ophiobolin T

OPU: Ophiobolin U

OPV: Ophiobolin V

OPW: Ophiobolin W

P-388: Mouse Leukemia Cell Line – egér leukémia sejtvonal

PDE: Foszfodiészteráz

PI – Propídium-jodid

RP-HPLC: Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography – Fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

SKMEL28: Human Malignant Melanoma Cell Line – humán malignus melanóma sejtvonal

# 2 Bevezetés

A *Bipolaris* nemzetség (*Ascomycota, Euascomycetes, Pleosporales, Pleosporaceae*) tagjai imperfekt fonalas gombák, melyek a természetben elsősorban fűféléken (*Poaceae*) fordulnak elő, de növényi maradványokról és talajból is izolálhatók. A nemzetség növénypatogén fajai az elmúlt évszázadban több esetben okoztak jelentős mezőgazdasági károkat. A fertőzés legjellemzőbb tünetei a csírafoltosodás és a levélüszög kialakulása, ugyanakkor egyes fajok a búza és árpa tőrothadását, valamint gyökérdőlését is okozhatják. . A *Bipolaris* és a velük közeli rokonságban álló *Curvularia* nemzetség képviselőinek teleomorf, azaz ivaros szaporodásra képes, törzseit korábban egyaránt a *Cochliobolus* nemzetségbe sorolták.

E nemzetségek tagjai sokféle másodlagos metabolitot termelnek, többek között szeszkviterpéneket (pl. sorokinianin), diterpéneket, illetve szeszterterpéneket. Ez utóbbiak csoportjába tartozik a változatos biológiai aktivitással bíró ophiobolinok családja. Napjainkig mintegy 50 biológiailag aktív ophiobolin származékot írtak le. Kezdetben fitotoxinokként azonosították őket, későbbi kutatások azonban rávilágítottak antimikrobiális, baktericid, fungicid, nematocid tulajdonságaikra is. Gombaellenes hatásukat részben a β-1,3-glükán-szintáz gátlásával magyarázzák. Az ophiobolinok családjának legismertebb és legtöbbet vizsgált tagja, az ophiobolin A (OPA) kalmodulin antagonista hatása már a 80-as években ismerté vált, és azóta is számos vizsgálat tárgyát képezi. Az OPA és néhány származéka, pl. 6-*epi*-ophiobolin A (6-e-OPA), 3-anhidro-6-*epi*-ophiobolin A (3-a-6-e-OPA) és ophiobolin I (OPI) citotoxikusnak bizonyult humán eredetű rákos sejtekkel szemben. Más ophiobolinoknak, például az ophiobolin C-nek (OPC) HIV-1 integráz gátló hatásuk van. Az ophiobolinokra, változatos biológiai aktivitásuk révén, egyre fokozódó figyelem irányul mind a növényvédelem, mind a gyógyászat, illetve a biotechnológia területén.

Jelen munkánkban célul tűztük ki az ophiobolinokról rendelkezésre álló ismeretek bővítését, különös tekintettel a termelés körülményeire, biológiai aktivitásukra, valamint stabilitásukra. Több *Bipolaris* törzs esetében megállapítottuk a termelési kinetikákat, majd a kiemelkedő ophiobolin termelők közül a *B. oryzae* SZMC 24163 törzzsel elvégeztük a termelési körülmények optimalizálását. E törzs bevonásával hatékony félpreparatív eljárást dolgoztunk ki az ophiobolin származékok tisztítására. Ezen eljárás eredményeként egy eddig le nem írt ophiobolin származék tisztítását valósítottuk meg számos már ismert ophiobolin származék sikeres tisztítása mellett. A tisztított vegyületek biológiai aktivitásának

vizsgálatával információkat nyertünk ezen vegyületek toxicitásáról. Továbbá vizsgáltuk a vegyület család legismertebb tagjának az OPA-nak a stabilitását szerves oldószerekben.

# 3 Irodalmi áttekintés

## 3.1 A *Bipolaris* nemzetség jellemzése

A *Bipolaris* nemzetség (*Ascomycota, Euascomycetes, Pleosporales, Pleosporaceae*) tagjai növénypatogén gombák, melyek főként a *Poaceae* családba tartozó fajokat fertőznek, mint például búza, rizs kukorica vagy cirok (Ellis 1971, Sivanesan 1987, Berbee és mtsi. 1999). Több, korábban a *Bipolaris* nemzetségbe sorolt fajt az újabb filogenetikai elemzések alapján mára a *Curvularia* nemzetség tagjaiként tartják számon (Manamgoda és mtsi. 2012), többek között az opportunista humánpatogénként is ismert *Curvularia australiensis*, *C. hawaiiensis* és *C. spicifera*, melyek phaeohyphomycosisok (azaz melanintermelő fonalas gombák által okozott fertőzések) okozói lehetnek (Kopper és Schaff 2004). A *Bipolaris* fajok ivartalanul, konídiumok segítségével szaporodnak. Barna konídiumtartóikban egyenes, orsó alakú vagy ívelt 6-10 sejtes konídiumok találhatók, melyek a két végükön kezdenek csíratömlőt fejleszteni (**1. ábra**). Erről a jellegzetes tulajdonságáról kapta a nevét a nemzetség. Telepeik színe a szürkésfehértől a feketéig változhat, de a tenyésztés 5. napjától jellemzően sötét színűek, melyet a gombafonalban és a konídiumokban felhalmozódó sötétbarna színanyag, a melanin okoz. A melanin elősegíti a fertőzést mind a növényi mind az emberi szervezetben azáltal, hogy védi gombát a környezeti stresszel szemben (Ikeda és mtsi. 2003). A *Bipolaris* nemzetség ivarosan szaporodó (teleomorf) alakjai a *Cochliobolus* nemzetségben találhatók. A két szaporodási forma között jelentős morfológiai és fiziológiai különbség van, így korábban ezeket külön nemzetségbe sorolták.

**1. ábra. *Bipolaris* fajok konídiumai: A: *B. maydis*, B: *B. microstegii* (Manamgoda és mtsi. 2014).**

A *Bipolaris* és rokon nemzetségeit eredetileg az egységes *Helminthosporium* nemzetségbe sorolták, később azonban morfológiai szempontok alapján felosztották ezt a nemzetséget a *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* és *Exserohilum* nemzetségekre (Sivanesan 1987). A *Bipolaris*hoz igen közelálló, szintén aszexuális *Curvularia* nemzetség teleomorf alakjai is a *Cochliobolus* nemzetségben találhatók.

A *Bipolaris*, *Cochliobolus* és *Curvularia* nemzetségek taxonómiai viszonyait Manamgoda és mtsi. (2012) tisztázták. Ezen nemzetségek harmincöt fajának 61 izolátumát részletes filogenetikai vizsgálat alá vetették, ahol egy többgénes vizsgálatot valósítottak meg ITS, GPDH, EF1-α és LSU génszekvenciákkal. Eredményeik alapján két csoport vált elkülöníthetővé. Az 1-es csoportba a *Cochliobolus heterostrophus*hoz közeli, erősen patogén, gazdaságilag jelentős *Bipolaris* és *Cochliobolus* fajok tartoznak, míg a 2-es csoportot a *C. lunatá*val rokon *Curvularia*, *Bipolaris*, *Cochliobolus*, valamint *Pseudochochliobolus* fajok alkotják. A *B. australiensis*, *B. coicis*, *B. ellisii*, *B. graminicola*, *B. hawaiiensis*, *B. ovariicola*, *B. ravenelii*, *B. spicifera*, *B. perotidis* és *B. tripogonis* fajok szintén a 2-es csoportba kerültek. Tekintettel arra, hogy mind a *Bipolaris*, mind pedig a *Culvuraia* elnevezések közismertebbek, a továbbiakban ezen nemzetségneveket célszerű használni.

A *Bipolaris* nemzetség tagjai egyaránt megtalálhatók fűféléken, növényi maradványokon és talajban. Növénypatogén fajaik számos alkalommal okoztak már súlyos gazdasági károkat világszerte. A cukornád egyik legjelentősebb kártevőjeként számon tartott *B. sacchari* jelentős terméskiesést okozott Jáva, Hawaii és Puerto Rico ültetvényein az 1920-as években. Az 1970-es években a *Bipolaris maydis* az Egyesült Államok, valamint Kanada területén okozott nagy károkat. A Közép-Nyugaton a várt termés 15%-a, Dél-Keleten 50%-a veszett kárba. Mindezek tükrében ezt a járványt tartják a XX. század egyik legrövidebb idő alatt, legnagyobb mennyiségű kukoricatermés elvesztésével járó járványának (Sugawara és mtsi. 1987). A fertőzés legjellemzőbb tünetei a csírafoltosodás, valamint a levélüszög kialakulása. Emellett egyes fajok a búza és árpa tőrothadását és gyökérdőlését okozzák (**2. ábra**). A „Déli kukorica levélüszög”, *B. maydis* okozta betegség tanulmányozása során megállapították, hogy patogenitás szempontjából két csoportra osztható a törzs. Az O (old) osztályú gombák kevésbé bizonyultak virulensnek, mint a T osztályúak, melyek elsősorban Texas hímsteril kukoricatörzseket fertőznek. Mindkét csoport tagjai egyaránt termeltek fitotoxint, azonban az O típusúak esetében a termelt toxin mennyisége alacsonyabbnak bizonyult a T típusúak által termelt toxin mennyiségénél, továbbá nem rendelkezett gazdaspecifitással (Berbee és mtsi. 1999).

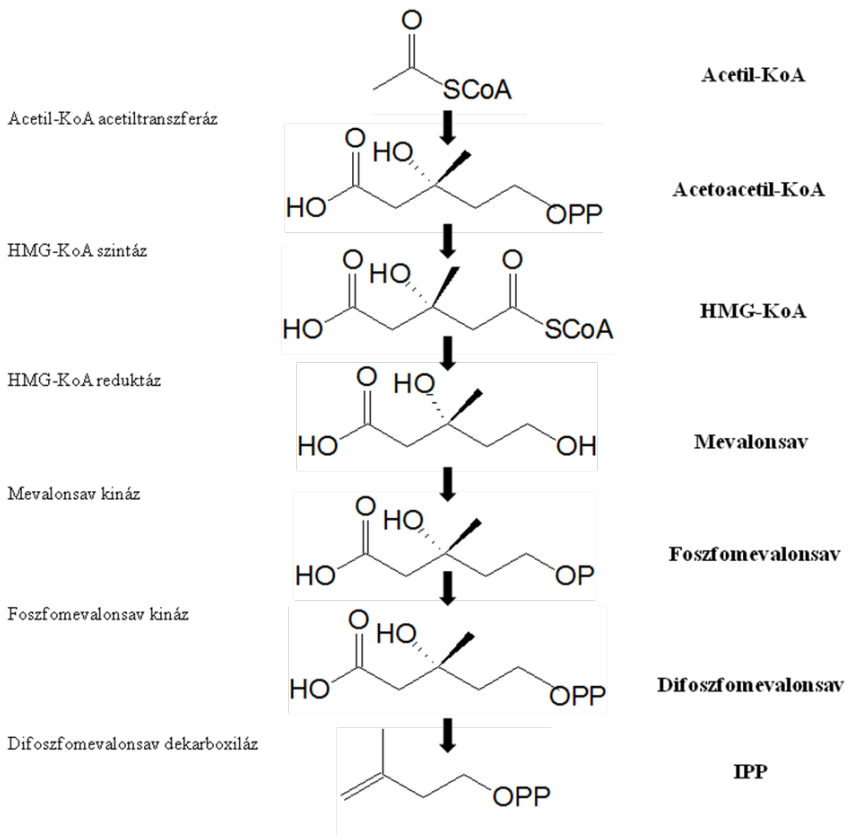
**2. ábra. *B. sorokiniana* által okozott betegség tünetei búza levelén (A), gyökerén (B) és búzaszemeken (C). (Kumar és mtsi. 2002)**

## 3.2 Az ophiobolinok kémiája

### *3.2.1 Az ophiobolinok bioszintézise, kémiai szerkezete, csoportosítása*

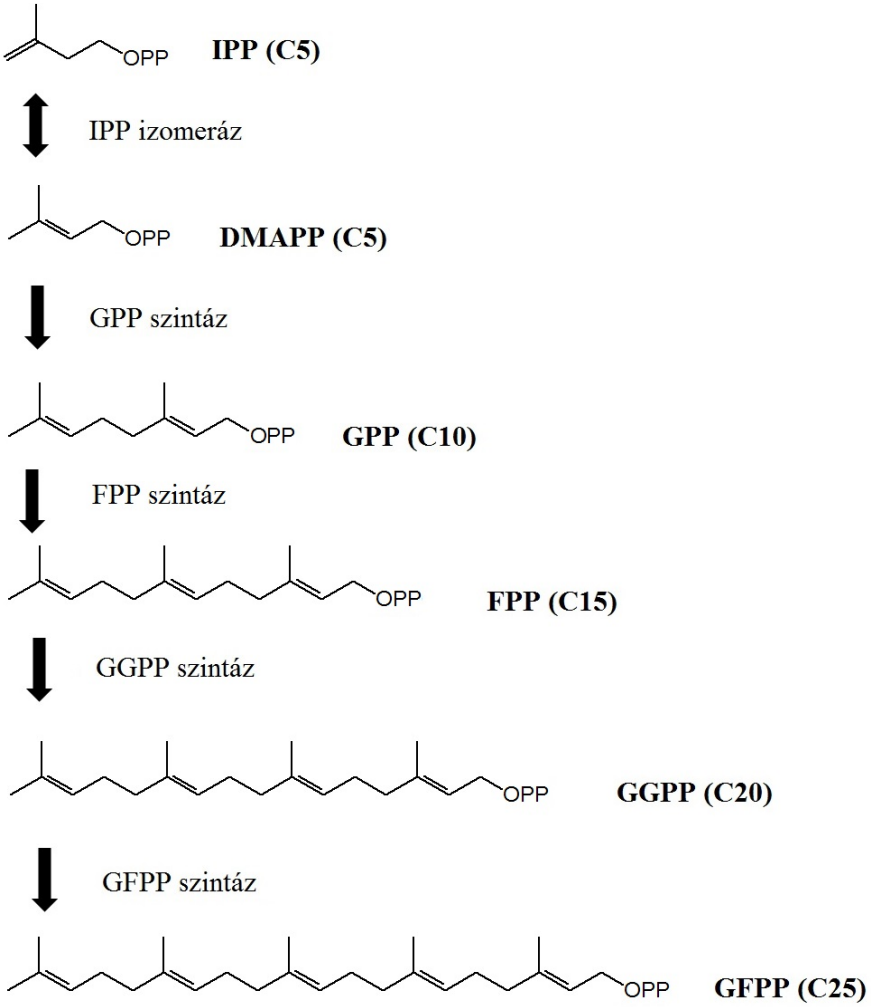
Az ophiobolinok a *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Cephalosporium*, *Aspergillus*, *Emericella* és *Ulocladium* nemzetségekbe sorolható gombafajok által termelt másodlagos anyagcseretermékek. Elsőként *B. oryzae*-ből tisztítottak és jellemeztek ophiobolint (Orsenigo 1957), melyet cochliobolinnak neveztek el. 1958-ban Nakamura és Ishibashi szintén sikeresen azonosította ezt a vegyületet, ők azonban ophiobolinnak nevezték el (Nakamura és Ishibashi 1958). A 60-as évek második feléig ezen vegyületcsalád nevezéktana nem volt egységes. A sorra azonosított vegyületeket ophiobolinnak, ophiobolosinnak, cochliobolinnak, zizazinnak és caphalonsavnak hívták, végül azonban ezeket a másodlagos anyagcseretermékeket ophiobolinoknak nevezték el (Tsuda és mtsi. 1967).

Az ophiobolinok a szeszterterpének csoportjába tartozó triciklikus (5-8-5 gyűrűs) 25-27 szénatomos hidrofób vegyületek. Bioszintézisük az úgynevezett klasszikus mevalonsav bioszintézis útvonalon megy végbe, mely során több lépésben kialakul az izoprénváz építőköve, az 5 szénatomos izopentenil-pirofoszfát (IPP) (**3. ábra**) (Lombard és Moreira 2011).

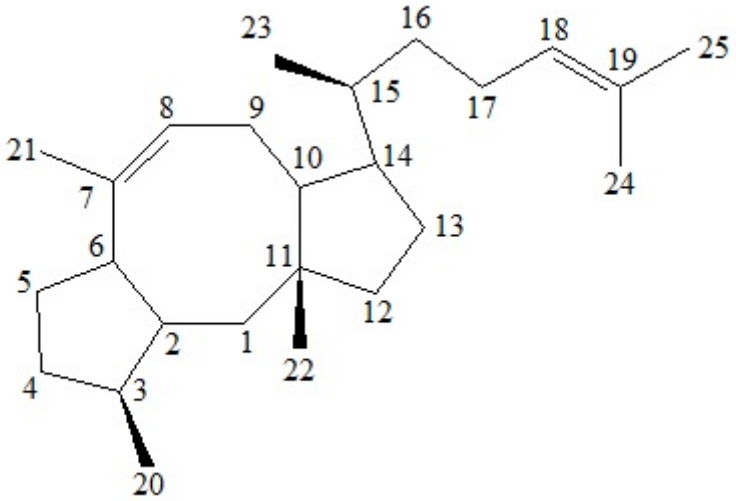



**3. ábra. A klasszikus mevalonsav útvonal.**

Az ophiobolinok bioszintézise a klasszikus mevalonsav útvonalon indul, majd a terpének specifikus bioszintézis útvonalán haladva a keletkezett IPP alegységek sorozatos összekapcsolódásával valósul meg (**4. ábra**). Az IPP izomeráz segítségével kialakul a dimetilallil-pirofoszfát (DMAPP). Egy IPP és egy DMAPP egység geranil-pirofoszfát (GPP) szintáz által katalizált összekapcsolódásával létrejön a 10 szénatomos GPP, mely a monoterpének további kialakulásának prekurzor vegyülete. A farnezil-pirofoszfát (FPP) szintáz biztosítja egy további IPP alegység kapcsolódását a GPP-hez, kialakítva ezzel a 15 szénatomos FPP-t, mely szeszkviterpének, illetve triterpének prekurzora. Az FPP-hez egy további IPP kapcsolódásával az immár 20 szénatomos geranilgeranil-pirofoszfát (GGPP) alakul ki, mely a terpének egyik legismertebb csoportjának, a karotinoidoknak is a prekurzor vegyülete. A 25 szénatomos geranilfarnezil-pirofoszfát (GFPP) egy további IPP egység kondenzációjával valósul meg, melyet, a GFPP szintáz katalizál.




**4. ábra. Terpének bioszintézis útvonala.**




**5. ábra. Az ophiobolinok triciklikus alapváza**

Az ophiobolinok kialakulása a GFPP ciklizációjával valósul meg, melyet már a korai szakirodalom is leír (**5. ábra**) (Canonica és mtsi. 1967, Nozoe és mtsi. 1968b). Az ophiobolinok egyes alcsoportjai a szénvázhoz kapcsolódó jellegzetes csoportokban különböznek egymástól. Az alcsoportok egyes analógjai pedig elsősorban sztereokémiai különbségeket mutatatnak. Példaként említhető az OPA sztereoizomerje a 6-e-OPA, melyben a 6. szénatomon található H atom α helyzetű hasonlóan a 3-anhidro-ophiobolin A-hoz (3-a-OPA) és 3-a-6-e-OPA-hoz. Napjainkig mintegy 50 ophiobolin származékot írtak le (**1. táblázat, 27. Melléklet**).

**1. táblázat. Napjainkig leírt ophiobolin származékok.**

| *Sorszám* | *Megnevezés* | *felfedezés éve* | *M (g/mol)* | *Összegképlet* | *Hivatkozás* |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | ophiobolin A | 1957 | 400,56 | $C_{25}H_{36}O_4$ | Orsenigo és mtsi. 1957 |
| **2** | ophiobolin B | 1961 | 402,57 | $C_{25}H_{38}O_4$ | Ishibashi 1961 |
| **3** | ophiobolin C | 1966 | 386,57 | $C_{25}H_{38}O_3$ | Nozoe és mtsi. 1966 |
| **5** | ophiobolin D | 1967 | 400,55 | $C_{25}H_{36}O_4$ | Itai és mtsi. 1967; Nozoe és mtsi. 1967 |
| **6** | ophiobolin F | 1968 | 358,61 | $C_{25}H_{42}O$ | Nozoe és mtsi. 1968a |
| **7** | ophiobolin A lakton | 1978 | 400.56 | $C_{25}H_{36}O_4$ | Rossi és mtsi. 1978 |
| **8** | ophiobolin G | 1984 | 366,54 | $C_{25}H_{34}O_2$ | Cutler és mtsi. 1984 |
| **9** | 3-anhidro-ophiobolin A | 1984 | 382,54 | $C_{25}H_{34}O_3$ | Kim és mtsi. 1984 |
| **10** | 3-anhidro-6-*epi*-ophiobolin A | 1984 | 382,54 | $C_{25}H_{34}O_3$ | Kim és mtsi. 1984 |
| **11** | ophiobolin H | 1984 | 386,57 | $C_{25}H_{38}O_3$ | Cutler és mtsi. 1984 |
| **12** | 6-*epi*-ophiobolin A | 1984 | 400,56 | $C_{25}H_{36}O_4$ | Kim és mtsi. 1984 |
| **13** | ophiobolin I | 1987 | 384,56 | $C_{25}H_{36}O_3$ | Sugawara és mtsi. 1987 |
| **14** | 25-hidroxi-ophiobolin I | 1987 | 400,56 | $C_{25}H_{37}O_4$ | Sugawara és mtsi. 1987 |
| **15** | 8-deoxiophiobolin J | 1988 | 384,56 | $C_{25}H_{36}O_3$ | Sugawara és mtsi. 1988 |
| **16** | 6-*epi*-ophiobolin I | 1988 | 384,56 | $C_{25}H_{36}O_3$ | Sugawara és mtsi. 1988 |
| **17** | ophiobolin J | 1988 | 400,56 | $C_{25}H_{36}O_4$ | Sugawara és mtsi. 1988; Yun és mtsi. 1988 |
| **18** | ophiobolin K | 1991 | 384,56 | $C_{25}H_{36}O_3$ | Singh és mtsi. 1991 |
| **19** | 6-*epi*-ophiobolin K | 1991 | 384,56 | $C_{25}H_{36}O_3$ | Singh és mtsi. 1991 |
| **20** | ophiobolin B lakton | 1995 | 402,57 | $C_{25}H_{38}O_4$ | Li és mtsi. 1995 |
| **21** | ophiobolin L | 1995 | 416,56 | $C_{25}H_{36}O_5$ | Li és mtsi. 1995 |
| **22** | 6-*epi*-ophiobolin L | 1995 | 416,56 | $C_{25}H_{36}O_5$ | Li és mtsi. 1995 |
| **23** | ophiobolin M | 1996 | 384,56 | $C_{25}H_{36}O_3$ | Tsipouras és mtsi. 1996 |
| **24** | 6-*epi*-ophiobolin M | 1996 | 384,56 | $C_{25}H_{36}O_3$ | Tsipouras és mtsi. 1996 |

| *Sorszám* | *Megnevezés* | *felfedezés éve* | *M (g/mol)* | *Összegképlet* | *Hivatkozás* |
|---|---|---|---|---|---|
| **25** | 6-*epi*-ophiobolin C | 1996 | 386,57 | $C_{25}H_{38}O_3$ | Tsipouras és mtsi. 1996 |
| **26** | 18,19-dihidro-ophiobolin C | 1996 | 388,59 | $C_{25}H_{40}O_3$ | Tsipouras és mtsi. 1996 |
| **27** | 6-*epi*-3-anhidro-ophiobolin B | 1999 | 384,56 | $C_{25}H_{36}O_3$ | Shen és mtsi. 1999 |
| **28** | 6-*epi*-ophiobolin G | 2004 | 366,54 | $C_{25}H_{34}O_2$ | Wei és mtsi. 2004 |
| **29** | 6-*epi*-ophiobolin N | 2004 | 368,56 | $C_{25}H_{36}O_2$ | Wei és mtsi. 2004 |
| **30** | ophiobolin E | 2006 | 382,54 | $C_{25}H_{34}O_3$ | Evidente és mtsi. 2006 |
| **31** | 8-*epi*-ophiobolin J | 2006 | 400,56 | $C_{25}H_{36}O_4$ | Evidente és mtsi. 2006 |
| **32** | (6α)-21,21-O-Dihidro-ophiobolin G | 2011 | 368,56 | $C_{25}H_{36}O_2$ | Liu és mtsi. 2011 |
| **33** | (5α,6α)-ophiobolin H | 2011 | 386,57 | $C_{25}H_{38}O_3$ | Liu és mtsi. 2011 |
| **34** | 5-O-metil-ophiobolin H | 2011 | 400,60 | $C_{26}H_{40}O_3$ | Liu és mtsi. 2011 |
| **35** | (5α,6α)-5-O-metil-ophiobolin H | 2011 | 400,60 | $C_{26}H_{40}O_3$ | Liu és mtsi. 2011 |
| **36** | (6α)-18,19,21,21-O-tetrahidro-18,19-dihidroxiophiobolin G | 2011 | 402,57 | $C_{25}H_{38}O_4$ | Liu és mtsi. 2011 |
| **37** | ophiobolin O | 2012 | 430,63 | $C_{27}H_{42}O_4$ | Yang és mtsi. 2012 |
| **38** | 6-*epi*-ophiobolin O | 2012 | 430,63 | $C_{27}H_{42}O_4$ | Zhang és mtsi. 2012 |
| **39** | 6-*epi*-21-dezoxio-phiobolin G | 2013 | 352,56 | $C_{25}H_{36}O$ | Liu és mtsi. 2013 |
| **40** | 6-*epi*-16,17-dihidro-21-dezoxi-ophiobolin G | 2013 | 354,58 | $C_{25}H_{38}O$ | Liu és mtsi. 2013 |
| **41** | ophiobolin V | 2013 | 368,56 | $C_{25}H_{36}O_2$ | Liu és mtsi. 2013 |
| **42** | ophiobolin U* | 2013 | 368,56 | $C_{25}H_{36}O_2$ | Liu és mtsi. 2013 |
| **43** | ophiobolin W | 2013 | 374,61 | $C_{25}H_{42}O_2$ | Liu és mtsi. 2013 |
| **44** | ophiobolin T | 2013 | 382,54 | $C_{25}H_{34}O_3$ | Wang és mtsi. 2013a |
| **45** | ophiobolin U* | 2013 | 386,57 | $C_{25}H_{38}O_3$ | Bladt és mtsi. 2013 |
| **46** | 3-anhidro-6-hidroxi-ophiobolin A | 2013 | 398,54 | $C_{25}H_{34}O_4$ | Wang és mtsi. 2013b |
| **47** | ophiobolin Q | 2013 | 400,56 | $C_{25}H_{36}O_4$ | Wang és mtsi. 2013b |
| **48** | ophiobolin P | 2013 | 400,56 | $C_{25}H_{36}O_4$ | Wang és mtsi. 2013b |
| **49** | ophiobolin R | 2013 | 414,59 | $C_{26}H_{38}O_4$ | Wang és mtsi. 2013b |
| **50** | ophiobolin S | 2013 | 432,60 | $C_{26}H_{40}O_5$ | Wang és mtsi. 2013b |

* Tekintettel arra, hogy a Liu és mtsi. (2013) által leírt vegyület szerkezetileg eltér a Bladt és mtsi. (2013) által közöltétől, valamint, hogy Liu és mtsi. publikációja korábban jelent meg, ezért javasoljuk, hogy az általuk leírt vegyület továbbra is ophiobolin U néven szerepeljen, míg a Bladt és mtsi. által közölt ophiobolin származéknak szükségszerű új nevet választani.

### *3.2.2 Az ophiobolintermelés és a vegyület stabilitása*

A mikroorganizmusok másodlagos metabolit termelése függ a tenyésztési körülményektől (Au és mtsi. 2000a). A *B. oryzae* egyes törzsei elsősorban OPA termelésükről

ismertek, azonban metioninnal kiegészített tápoldatban ophiobolin A-lakton (OPA-lakton) megjelenését lehetett detektálni (Rossi és mtsi. 1978). A tápközeg halmazállapota is befolyással bír az ophiobolinok termelésére. *B. maydis* folyékony tápközegben OPA-t, 3-a-OPA-t, ophiobolin B-t (OPB), illetve ophiobolin L-t (OPL) szekretál (Li és mtsi. 1995), míg szilárd táptalajon tenyésztve 6 másik ophiobolin származékot detektáltak, név szerint ophiobolin M (OPM), 6-*epi*-ophiobolin M (6-e-OPM), OPC, 6-*epi*-ophiobolin C (6-e-OPC), ophiobolin K (OPK) és 6-*epi*-ophiobolin K (6-e-OPK) (Tsipouras és mtsi. 1996). A termelt másodlagos anyagcseretermékek minősége és mennyisége függ a gomba fiziológiás állapotától is. Xiao és mtsi. (1991) megfigyelték, hogy a tápközegben tenyésztett *B. oryzae* OPA-t, 6-e-OPA-t, 3-a-OPA-t, 3-a-6-e-OPA-t és OPI-t termel, míg spóracsírázás során csupán OPA-t és OPB-t.

Az ophiobolinok stabilitásáról a szakirodalom igen szűkszavúan nyilatkozik. Yun és mtsi. (1988) megfigyelték, hogy az ophiobolinok -70 °C-on olajos vagy metanolos oldatban bizonyultak a legstabilabbnak. A tárolási hőmérséklet emelésével a vizsgált vegyületek stabilitásában drámai változásokat tapasztaltak, -20 °C-on 75%-ra, 4 °C-on 65%-ra, 22 °C-on 40%-ra, míg 30 °C-on 25%-ra csökkent a mennyiségük a három hetes tárolási időszak során. Szintén ezen kutatócsoport figyelte meg, hogy agar tartalmú táptalajhoz adagolva az ophiobolinok megőrizték stabilitásukat (Yun és mtsi. 1988). Egy másik vizsgálat során azt tapasztalták, hogy az OPA MEM (minimum essential medium) tápközegben 37 °C-on 7 nap inkubációt követően jelentős bomlást mutatott, ahol a fő bomlástermékként a 3-a-6-e-OPA-t határozták meg (Bury és mtsi. 2013a). A HPLC vizsgálatok alapján a kezdetben 97%-os tisztaságú OPA a vizsgálati időszak végére 71% tisztaságot mutatott. Az OPA bomlása TBY-2 növényi sejtkultúra tápközegben ennél is nagyobb mértéket mutatott, már 4 napi inkubációt követően az OPA 40%-a 3-a-6-e-OPA-vá alakult (Bury és mtsi. 2013a).

### *3.2.3 Az ophiobolinok tisztítása*

Rossi mtsi. (1978) *B. oryzae* kloroformos extraktumából szilikagél oszlopon tisztítottak OPA-laktont, mozgófázisként kloroform és etil-acetát változó összetételű elegyét alkalmazva. A kapott frakciók tisztaságát vékonyréteg-kromatográfiás technikával (TLC) ellenőrizték, ahol a futtatóelegy kloroform:etil-acetát (70:30) volt. A tisztított vegyületet végül *n*-hexán - etil-acetát elegyből kristályosították.

Az extrahálást azonban nem csak egy, hanem akár több lépésben is lehet alkalmazni. Cutler és mtsi. (1984) *Aspergillus ustus* PDA tenyészetét először acetonnal extrahálták, majd szűrés és bepárlás után a kapott extraktumot etil-acetáttal partícionálták, végül a kapott mintát szilikagél oszlopon frakcionálták benzol, dietil-éter, etil-acetát, aceton, acetonitril felhasználásával. Az így nyert frakciók további tisztítását többlépéses félpreparatív HPLC technikával C18, illetve szilikagél oszlopokon valósították meg acetonitril:víz (1:1), valamint benzol:etil-acetát (9:1) oldószerelegyeket használva mozgófázisként. A tisztítási eljárás végén ophiobolin G (OPG) és OPH másodlagos metabolitokat kaptak eredményül.

OPA és 6-e-OPA tisztítását *D. oryzae* etil-acetátos extraktumából valósították meg flash-kromatográfiával (Sugawara és mtsi. 1988) kloroform:MeOH (25:1) és toluol:etil-acetát (2:1) eluenseket használva. Az így kapott frakciók tisztaságát fordított fázisú HPLC-vel ellenőrizték MeCN:$H_2O$ (65:35) elegyét használva eluensként, 254 nm-es detektálási hullámhosszon.

*B. sorghicola* (jelenleg *Bipolaris cookei*, Manamgoda és mtsi. 2012) által termelt 6-e-OPA és 3-a-OPA tisztításának első lépéseként a fermentlé etil-acetáttal történő extrakcióját valósították meg, majd kétlépéses kombinált módszerrel végezték el a vegyületek tisztítását. Az előtisztítási lépésben Sugawara és mtsi. (1988) munkájához hasonlóan flash-kromatográfia került alkalmazásra benzol:aceton (95:5 → 80:20) oldószergrádiens mellett (Sugawara és mtsi. 1988). Az így kapott frakciók végső tisztítási lépését pedig preparatív TLC-vel valósították meg, 6-e-OPA esetén benzol:aceton (75:25), míg a 3-a-OPA esetén dietil-éter:benzol (3:2) oldószerelegyekkel (Pena-Ridriguez és Chilton 1989).

Singh és mtsi. (1991) OPK és 6-e-OPK *A. ustus*ból történő tisztítására szintén kétlépéses eljárást alkalmaztak. A gomba szilárd fázisú fermentációját követően az extrakciót metil-etil-ketonnal valósították meg, majd szilikagél oszlopon $CH_2Cl_2$:MeOH (99:1) eluenssel végezték a preparatív tisztítás első lépését. Ezt követte egy RP-HPLC lépés Whatman 22 x 250 mm oszlopon MeCN:$H_2O$ (60:40) → MeCN:$H_2O$ (100:0) gradiens program mellett.

Xiao és mtsi. (1991) *B. oryzae* fermentlevéből, illetve spóracsírázási tápközegéből tisztítottak 6 különböző ophiobolin származékot. Mindkét tápközegből etil-acetátos extrakcióval vonták ki a másodlagos gombametabolitokat, majd szilikagél oszlopon több lépésben választottak el: kloroform, kloroform:aceton (9:1), kloroform:aceton (4:1), aceton gradienst használva. Az egyes ophiobolin analógok már az első két frakcióban jelen voltak, így ezeket tovább frakcionálták benzol:etil-acetát:ecetsav (50:50:1) elegyével. A kapott alfrakciók tisztaságát RP-HPLC-n ellenőrizték (MeCN:$H_2O$ 80:20, 0,5 ml/min, 225 nm és 260

nm). Végső lépésként preparatív RP-HPLC tisztítást valósítottak meg (MeCN:$H_2O$ (80:20) elegyével, 5 ml/min), melynek eredményeként a fermentléből 6-e-OPA-t, OPA-t, OPI-t, 6-e-3-a-OPA-t és 3-a-OPA-t sikerült kinyerni, míg a spóracsírázási tápközegből az OPA mellett OPB-t is tisztítottak.

Szintén metil-etil-ketonos extrakciót alkalmaztak *B. maydis* esetében, ahol egy kétlépéses preparatív eljárás első lépése méretkizárásos kromatográfia volt, majd a kapott frakciók tovább tisztítását RP-HPLC technikával valósították meg (MeCN:$H_2O$ (55:45), 8 ml/min). Eredményül OPM-t és 6-*epi*-OPM-t kaptak (Tsipouras és mtsi. 1996).

3-a-OPA és 3-a-6-e-OPA *Helminthosporium* fajokból történő extrakcióját Kim és mtsi. (1999) szintén etil-acetáttal valósították meg. A komponenseket egy többlépéses oszlopkromatográfiás (etil-acetát:hexán (2:1)), valamint preparatív rétegkromatográfiás eljárással tisztították ki. Az ophiobolin származékok végső tisztítási lépéseként egy újabb normál fázisú elválasztást alkalmaztak, ahol az optimális eluens összetétel kloroform:metanol (98:2) volt.

Shen és mtsi. (1999) *Bipolaris maydis* fermentlevének etil-acetátos kivonatát háromlépéses preparatív oszlopkromatográfiás eljárással tisztították. Érdekes módon a frakcionálás első lépéseként RP C-18 10 x 250 mm, 5µm (Phenomenex) folyadékkromatográfiás oszlopot alkalmaztak MeCN:$H_2O$ (3:2) eluens mellett, majd ezt követte egy NP-HPLC tisztítás, 10 x 250 mm, 5µ oszlopon hexán:etil-acetát (1:1) mozgófázissal, 1,5 ml/min áramlási sebesség mellett. Végül ismét RP-HPLC-n választották el a mintakomponenseket MeCN:$H_2O$ (4:1) elegyét használva eluensként 2 ml/min áramlási sebesség mellet. A preparatív eljárás eredményeként sikeresen kitisztították a 6-e-3-a-OPB-t.

OPA tisztítását és L1210 sejtvonallal szembeni apoptotikus aktivitásának tesztelését Fujiwara és mtsi. (2000) végezték el. Az f-7438 gombatörzs fermentlevéből etil-acetáttal előállított extraktumot először normál fázison frakcionálták toluol:aceton (5:1) eluens felhasználásával, majd az így kapott frakciókat fordított fázisú HPLC technikával oldószergrádiens mellett tovább tisztították (MeCN:$H_2O$ (30:70) → MeCN:$H_2O$ (100:0)).

Shing és mtsi. (2003) indiai királymókus ürülékéből izolált, 28S RNS D1-D2 régiójának szekvenciája alapján *Neosartorya*-ként azonosított MF6942 jelű törzsből tisztítottak ophiobolint. A folyadék tenyészetet metil-etil-keton segítségével extrahálták, majd méretkizárásos kromatográfiás technikával (Sephadex LH20, metanol) valósították meg a tisztítás első lépését. Ezt követően az aktív frakciókat tovább tisztították szilikagél oszlopon aceton:hexán (10:90) elegyét használva eluensként, majd a kapott alfrakciókat RP-HPLC-n

MeCN:$H_2O$ (65:35) + 0,1% trifluor-ecetsav jelenlétében tovább tisztították, melynek végén OPC-t és OPK-t nyertek, melyeket HIV-1 integráz enzim gátlási vizsgálatában használtak fel.

Egy szintén fonalas *Ascomycota* fajból, *Mollisia* sp.-ből Jayasuriya és mtsi. (2004) metil-etil-ketonnal OPC-t vontak ki, melynek preparatív tisztítását RP-HPLC-s technikával valósították meg Zorbax RX C-8 21 x 250 mm oszlopon, 30 perces gradiens elúcióval (MeCN:H2O (30:70) → MeCN:$H_2O$ (90:10)), 8 ml/min áramlási sebesség mellett.

A szintén *Ascomycota* csoportba tartozó *Emericella variecolor* fermentlevének etil-acetátos extraktumát normál fázisú oszlopkromatográfiával mozgófázisként alkalmazott *n*-hexán:etil-acetát segítségével frakcionálták, majd fordított fázisú HPLC-n tovább tisztítva (MeOH:$H_2O$ (85:15)) az OPK, 6-e-OPK, 6-e-OPC, 6-e-OPG és 6-e-OPN frakcionálását valósították meg. Szilárd táptalajból szintén ezzel az eljárással OPG, 6-e-OPG, OPH, 6-e-OPN tisztítását valósították meg (Wei és mtsi. 2004).

Evidente és mtsi. (2006) *Drechslera gigantea* folyadéktenyészetéből származó liofilizált anyag extrakcióját etil-acetáttal végezték, majd NP-HPLC technikával kloroform:izopropanol (96:4) eluens mellett frakcionálták. Az így kapott frakciókat a továbbiakban preparatív rétegkromatográfiával tovább tisztították, melynek eredményeként OPA-t, 6-e-OPA-t, 3-a-6-e-OPA-t és OPI-t kaptak.

A *B. oryzae* fermentlevéből etil-acetátos extrakcióval nyert anyagot flash-kromatográfiával elválasztották (etil-acetát:víz (0:1) → etil-acetát:víz (1:0)), majd ezt követően RP-HPLC eljárással (MeCN:$H_2O$, (65:35)) tovább tisztították, és végül sikeresen izoláltak 4 ophiobolin származékot, név szerint az OPA-t, a 6-e-OPA-t, a 3-a-OPA-t és az OPI-t (Phuwapraisirisan és mtsi. 2007).

Wang és mtsi. (2013b) *B. oryzae* fermentlevéből a potenciális ophiobolin analógokat etil-acetátos extrakcióval nyerték ki, majd NP-HPLC segítségével frakcionálták, ahol az elválasztást az etil-acetát:*n*-hexán oldószergrádiens biztosította. Az ígéretes frakciók tovább tisztítását RP-HPLC eljárással valósították meg, ahol eluensként MeOH:$H_2O$ (70:30), MeCN:$H_2O$ (58:42) és diklórmetán:MeOH (1:1) elegyeket használtak. A preparatív munkák eredményeként 3-a-OPA-t, 3-a-6-e-OPA-t, valamint egy új ophiobolin származékot a 3-a-6-OH-OPA-t tisztítottak.

Ugyanez a kutatócsoport *Ulocladium* izolátum rázatott tenyészetét szűrte, majd a micéliumot acetonnal extrahálta. Az így kapott anyag frakcionálását szilikagél oszlopkromatográfiával valósították meg petroléter:etil-acetát oldószergrádiens mellett. A HepG2 sejtvonallal szemben citotoxikus frakciókat a továbbiakban többlépéses preparatív

RP-HPLC eljárással tisztították (MeOH:$H_2O$, illetve MeCN:$H_2O$ eluensekkel. A tisztítási eljárás végén sikeresen izoláltak 5, eddig még nem leírt ophiobolin analógot, az OPP, OPQ, OPR, OPS és OPT vegyületeket (Wang és mtsi. 2013a).

## 3.3 Az ophiobolinok biológiai hatása

### *3.3.1 Az ophiobolinok fitotoxikus hatása*

Az elsősorban növénypatogénként ismert *Bipolaris* fajok a barna levélfoltosság nevű betegséget okozzák, képesek parazitaként megtámadni olyan mezőgazdaságilag fontos növényeket, mint a rizs, kukorica és a cirok. A növénypatogén *Bipolaris* fajok felelősek az 1943-as Bengáli rizs éhínségért (Padmanabhan 1973), illetve az 1970-71-es déli kukorica levélüszög járványért (Tatum 1971), mely utóbbi az Egyesült Államokban okozott jelentős gazdasági károkat. A *Bipolaris* nemzetség tagjai azonban nem csak Indiában és az Egyesült Államokban fenyegetik a mezőgazdasági terményeket, hanem hazánkban is (Koncz és mtsi. 1974, Csősz 2005). A *Bipolaris oryzae* által okozott barna levélfoltosság egyike a legjelentősebb rizst fertőző betegségeknek. A betegség jellegzetes tünete, hogy a gomba által termelt toxinok hatására a leveleken sötétbarna színű, kerek vagy ovális alakú foltok jelennek meg és a parenchyma sejtek pusztulását okozzák. A levélen okozott léziók hatására csökken a fotoszintézisre alkalmas felületet, valamint a klorofill A és B koncentrációja egyaránt. Hasonló koncentrációcsökkenést lehetett megfigyelni a karotinoidok esetében is, habár ebben az esetben a csökkenés mértéke nem bizonyult olyan jelentősnek, mint az említett növényi pigmentek esetében (Dallagnol és mtsi. 2011).

Hat különböző rizs növény (S-201, Samnam, Nakdong, Aichi-asahi, Es-18, IR-8) fitotoxicitási vizsgálata során azok leveleit megsebezve különböző ophiobolinokkal kezelték a növényeket. A *B. oryzae*-ből tisztított 7 különböző ophiobolin származékot (OPA, 6-e-OPA, 6-e-3-a-OPA, OPI, ophiobolin J (OPJ), 25-hidroxi-ophiobolin I (25-OH-OPI) és OPB) vizsgálták, melynek során a 6-e-OPA bizonyult a legtoxikusabbnak, míg OPJ és OPI növénykárosító hatása volt a leggyengébb a vizsgált tesztvegyületek között (Yun és mtsi. 1988).

Pena-Rodriguez és Chilton (1989) szintén levélsebzési kísérletekben vizsgálták az ophiobolinok növényekre gyakorolt hatását. A fehércirokot fertőző *Bipolaris sorghicolá*ból tisztított négy különböző ophiobolin (OPA, a 6-e-OPA, a 3-a-OPA és a 6-e-3-a-OPA) felhasználásával 2, 1, 0,5, 0,2, 0,1 és 0,05 mg/ml koncentrációkban tesztelték azok

fitotoxicitását cirokon, sarlófűn és a kukoricán. Megállapították, hogy az OPA és a 6-e-OPA bizonyult a legtoxikusabbnak ezen növényekkel szemben, míg anhidro származékaik jelentősen gyengébb hatást váltottak ki.

Rizs, árpa, kukorica, szója, cirok, lúdfű, szerbtövis és a bársonylevél bevonásával hat ophiobolin analógot (OPA, 3-a-OPA, OPB, 6-e-OPA, 6-e-3-a-OPA, OPI) vizsgáltak 400 µg/ml koncentrációban levélsebzési tesztekben. A vizsgált másodlagos metabolitok közül csupán az OPA és a 3-a-OPA bizonyultak fitotoxikusnak, esetükben a tesztelt növények levelein nekrotikus elváltozásokat lehetett megfigyelni (Kim és mtsi. 1999).

Evidente és mtsi. (2006) arra keresték a választ, hogy az általuk *D. gigantea*-ból tisztított ophiobolinok (OPA, 6-e-OPA, 6-e-3-a-OPA és OPI) mutatnak-e különbséget fitotoxicitás tekintetében egy-, illetve kétszikű növények között. A kísérletekbe egyszikű fűféléket (vadzab, meddő rozsnok, csillagpázsit, pirók, ujjasmuhar, kakaslábfű, kanári datolyapálma, zöld muhar) és kétszikű gyomnövényeket (szőrös disznóparéj, fehér libatop, mezei szulák, fehér kányazsázsa és szelíd csorbóka) vontak be. Megállapították, hogy az OPA toxicitása a legnagyobb a vizsgálatba bevont ophiobolin származékok között, őt követi a 6-e-OPA, majd a 6-e-3-a-OPA, mely csupán néhány tesztnövény esetében bizonyult toxikusnak. Az OPI egyik vizsgált növénnyel szemben sem mutatott fitotoxicitást. További érdekes eredmény, hogy az egyszikűek érzékenyebbek voltak az ophiobolinokra, mint a kétszikűek. A szerkezet-hatás összefüggés tanulmányozásakor megállapították, hogy bizonyos molekulaszerkezeti elemek kiemelt szerepet játszanak az egyes ophiobolin analógok fitotoxicitásában, ilyen a 3. szénatomon lévő hidroxilcsoport, a 6. szénatom sztereokémiája, valamint a 7. szénatomhoz kapcsolódó aldehid csoport.

Szintén ez a kutatócsoport vizsgálta az OPB-t, OPJ-t, ophiobolin E-t (OPE) és 8-*epi*-ophiobolin J-t (8-e-OPJ) vad vörös zabon és egérárpán levélsebzési kísérletekben 0,5 mg/ml koncentrációban. Az OPB és OPJ toxikusnak bizonyultak a tesztelt növényekkel szemben, azonban az OPE és a 8-e-OPJ nem mutattak fitotoxikus hatást (Evidente és mtsi. 2006).

Az OPA dohánysejtekre (TBY-2) gyakorolt hatásának vizsgálata során már 4 µg/ml koncentráció mellett sejthalált lehetett megfigyelni, továbbá 2 µg/ml koncentrációban ugyanezen növényen gátolta a sejtek növekedését. A kezelés után egy nappal az OPA-t kimosva a sejtekből és friss toxinmentes tápközeghez juttatva azokat, a toxin hatását teljes mértékben sikerült megszüntetni és a dohánysejtek növekedése zavartalan ütemben haladt tovább. A kísérletbe bevont 6-e-3-a-OPA nem bizonyult fitotoxikusnak a TBY-2 dohány sejtekre (Bury és mtsi. 2013a).

### *3.3.2 Az OPA kalmodulingátló hatása*

Az OPA kiemelkedő fitotoxikus aktivitását elsősorban kalmodulin antagonista hatásával magyarázzák. Számos tanulmány igyekezett feltárni az OPA kalmodulin antagonista hatásának mechanizmusát (Leung és mtsi. 1988, Li és mtsi. 1995, Au és mtsi. 1998, Au és mtsi. 2000b). Az eukarióta sejtek fő $Ca^{2+}$-kötő fehérjéje a kalmodulin, mely foszfodiészteráz (PDE) aktivátorként (Cheung és mtsi. 1971), valamint a sejtciklus előrehaladásáért is felel (Kahl és mtsi. 2003, Bury és mtsi. 2013b). Leung és mtsi. (1984) sikeresen bebizonyították, hogy az OPA gátolja a kalmodulinfüggő ciklikus nukleotid foszfodiészteráz enzim működését, mégpedig azáltal, hogy irreverzibilisen kötődik a kalmodulin lizin aminosavjához (Leung és mtsi. 1988). Szintén ez a kutatócsoport bizonyította, hogy az OPA kalmodulin gátló hatása $Ca^{2+}$ jelenlétében sokkal erősebb (Leung és mtsi. 1985).

Az OPA kalmodulin inaktivációjának vizsgálatát nem csak növények esetében vizsgálták. Au és mtsi. (2000b) megállapították, szarvasmarha agyában lévő kalmodulin esetében egyetlen OPA molekula kötődése elegendő annak inaktivációjához. Az OPA potenciális kötőhelyeit vizsgálva azt találták, hogy három lizin aminosav (75, 77 és 148) szolgálhat kötőhelyül az OPA számára, de leghatékonyabbnak a 75. lizinhez való kötődés bizonyult, ekkor 70%-kal csökkent a kalmodulin PDE-aktiváló képessége.

### *3.3.3 Az ophiobolinok antimikrobiális hatása*

OPA-t, OPB-t, OPL-t, OPI-t, OPA laktont, OPB laktont és 6-*epi*-ophiobolin L-t (6-e-OPL) teszteltek *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, valamint *Mycobacterium intracellulare* mikroorganizmusokkal szemben 1 mg/ml koncentrációban. A metabolitok gyenge *Cryptococcus* ellenes aktivitást mutattak, azonban erőteljesen gátolták a *T. mentagrophytes* növekedését. Az *E. coli*val szemben egyik tesztelt ophiobolin analóg sem bizonyult aktívnak. Az OPA és a 6-e-OPL erős antibakteriális hatást mutatott *S. aureus* esetében. A vizsgálatba bevont ophiobolinok közül egyedül az OPA fejtett ki erős, növekedésgátló hatást a *C. albicans*ra. Egy párhuzamos kísérletben kiderült, hogy az OPA MIC értéke *C. albicans* (12,5 μg/ml), *Aspergillus flavus* (25 μg/ml), *T. mentagrophytes* (12,5 μg/ml), *Torulopsis cremoris*

(0,2 μg/ml), *Torulopsis petrophilum* (1,56 μg/ml), ami a *T. cremoris* kivételével minden esetben alacsonyabbnak bizonyult az Amphotericin B alkalmazásakor mért értékeknél (Li és mtsi. 1995).

Az OPA-t, 6-e-OPA-t, 6-e-3-a-OPA-t és OPB-t 1 mg/ml koncentrációban tesztelték *Erwinia carotovora, Streptomyces griseus, Pseudomonas putida, Xanthomonas campestris* baktériumokon (Kim és mtsi. 1999). Az ophiobolinok gátolták a *S. griseus* növekedését, azonban a Gram-negatív baktériumokra nem voltak hatással. Ezen vegyületek 1 mg/ml koncentrációban tesztelésre kerültek *Alternaria alternata, Botrytis cinerea, Bipolaris maydis, Fusarium oxysporum, Magnaporthe grisea, Pythium graminicola és Thanatephorus cucumeris* gombákon is. A négy ophiobolin közül az OPB az összes gomba növekedését gátolta, aktivitás tekintetében őt követte rendre az OPA és a 3-a-6-e-OPA. A 6-e-OPA inaktívnak bizonyult a vizsgálatba bevont gombákkal szemben.

A 3-anhidro-6-hidroxi-ophiobolin A (3-a-6-OH-OPA) képes volt gátolni a *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), a *S. aureus* (ATCC 6538) és methicillinrezisztens *S. aureus* (MRSA) növekedését 12,5 μg/ml MIC érték mellett. Ezen kívül a 3-a-6-OH-OPA 50 μg/ml koncentrációban hatékonynak bizonyult a *C. albicans* SC5314 törzsével szemben is (Wang és mtsi. 2013b).

Az OPK, 6-e-OPK és 6-*epi*-ophiobolin G (6-e-OPG) biofilmképződést gátló hatását *Mycobacterium smegmatis* esetében bizonyították, ahol a vizsgálatba bevont tesztvegyületek MIC értékei rendre 4,1 μM, 65 μM és 17 μM voltak. Ebben a kísérletben az OPK hatását *M. bovis* BCG törzzsel szemben is vizsgálták, és megállapították, hogy MIC 8,2 μM koncentráció mellett gátolta a biofilm képződést (Arai és mtsi. 2013).

### *3.3.4 Az ophiobolinok nematocid hatása*

Az OPK-t és a 6-e-OPK-t tesztelték 100 μg/ml koncentrációban *C. elegans* fonálféreggel szemben. Az OPK esetében az $ED_{50}$ érték 10 μg/ml volt, a 6-e-OPK pedig hatástalannak bizonyult (Singh és mtsi. 1991, Tsipouras és mtsi. 1996). Az OPM $LD_{50}$ = 5,2 μg/ml és 6-e-OPM, valamint OPC ($LD_{50}$ = 2 μg/ml) és 6-e-OPC is nematocid aktivitást mutatott. (Tsipouras és mtsi. 1996).

### *3.3.5 Az ophiobolinok citotoxikus hatása*

Számos tanulmány irányult a különböző ophiobolin analógok citotoxikus hatásának vizsgálatára. Shen és mtsi. (1999) az OPA az A-549 (humán alveoláris epitélsejt eredetű adenokarcinóma), a HT-29 (humán vastagbél adenokarcinóma) és a Mel-20 (egér eritroleukémia) sejtvonalakra gyakorolt hatását vizsgálva megállapították, hogy $IC_{50}$ = 50 ng/ml értéknél citotoxikusnak bizonyult, míg a P-388 (egér leukémia sejtvonallal) szemben már $IC_{50}$ = 25 ng/ml koncentrációban hatásos volt.

Egy másik kutatócsoport eredményei alapján az OPA az L1210 (egér leukémia) sejtvonal esetében 4-400 ng/ml koncentrációban citotoxikus hatást fejtett ki és apoptózist indukált (Fujiwara és mtsi. 2000).

Az OPI citotoxicitásának vizsgálata során erős hatást tapasztaltak HeLa (méhnyakrák) és KB (nyaki adenokarcinóma) sejtek ellen, az $IC_{50}$ értékek rendre 0,1 μg/ml és 0,9 μg/ml voltak (Phuwapraisirisan és mtsi. 2007).

Yang és mtsi. (2012) *Aspergillus ustus*ból sikeresen tisztítottak egy másodlagos metabolitot, melyet a szerkezetvizsgálatok alapján ophiobolin O-ként azonosítottak. Ezen vegyületnek MCF-7 (humán emlő adenokarcinóma) sejtvonalra kifejtett hatását vizsgálva megállapították, hogy már alacsony koncentrációban növekedésgátló hatása van ($IC_{50}$ = 7,1 μg/ml) és apoptózist indukált azáltal, hogy a sejtciklust gátolta a $G_0/G_1$ fázisban.

Tíz ophiobolin származék (OPA, 3-a-OPA, 3-a-6-e-OPA, OPB, OPC, 6-e-OPG, ophiobolin H (OPH), OPK, 6-e-OPK és 6-*epi*-ophiobolin N (6-e-OPN) hatását vizsgálták CLL (krónikus limfocitás leukémia) sejtvonalon (Bladt és mtsi. 2013). Közülük 4 vegyület, az OPA (0,4 ng/ml), OPB (0,8 ng/ml), OPC (3,2 ng/ml) és OPK (1,6 ng/ml) mutatta a legerősebb citotoxikus aktivitást az $IC_{50}$ értékek szerint, míg a 3-a-OPA, 3-a-6-e-OPA, 6-e-OPG, OPH, 6-e-OPK és a 6-e-OPN nem fejtettek ki számottevő hatást a CLL sejtekre. Az ophiobolinok szerkezet-hatás összefüggésében kijelenthető, hogy a CLL sejtekkel szembeni toxicitás kialakításában számottevő szerepe van a 3. szénatom hidroxilcsoportjának, illetve a 21. szénatom aldehid csoportjának, továbbá az A/B-cisz gyűrűs szerkezetnek (Bladt és mtsi. 2013).

A Wang és mtsi. (2013b) által *B. oryzae*ből tisztított 3-a-6-OH-OPA erős növekedést gátló hatást mutatott HepG2 (humán máj karcinóma) és K562 (humán eritroleukémia) sejtvonalakkal szemben, ahol az $IC_{50}$ értékek rendre 2,6 μg/ml és 1,6 μg/ml voltak.

Az OPK humán és egér sejtvonalakra gyakorolt hatását Wei és mtsi. (2004) vizsgálták részletesebben, és meghatározták az $IC_{50}$ értékeket, melyek az NCI-H460 (humán tüdőrák) sejtvonal esetében 140 ng/ml, a HOP18 (humán tüdőrák) sejtvonal esetében 228 ng/ml, a MDA-MB-231 (humán emlőrák) sejtvonal esetén 260 ng/ml, a T-47D (humán emlőrák) sejtvonal esetén 228 ng/ml, ACHN (humán vese adenokarcinóma) sejteknél 132 ng/ml, HCT116 (humán vastagbélrák) 108 ng/ml, P-388 sejteknél 204 ng/ml és P-388/ADR (adriamycinrezisztens egér leukémia) sejteknél 144 ng/ml volt.

Az OPA és a 3-a-6-e-OPA három emberi tumor, az A-549, az SKMEL28 (humán malignus melanóma), a Hs683 (humán glióma), valamint a B16F10 (egér melanóma) sejtvonalon lett tesztelve. Az $IC_{50}$ az OPA esetén az A-549 sejtek esetében 168 ng/ml, az SKMEL28 sejtvonalon 148 ng/ml, a Hs683 sejtvonalon 248 ng/ml, míg a B16F10 sejteken 116 ng/ml volt. Az $IC_{50}$ érték a 3-a-6-e-OPA esetén A-549 sejteken 12 μg/ml, a SKMEL28 sejteken 10,8 μg/ml, a Hs683 sejteken 12 μg/ml és a B16F10 sejteken 8,8 μg/ml volt. Az OPA-t tesztelték multidrog rezisztens HL60 (humán promielocita leukémia), A2780 (humán petefészekrák), GLC4 (humán kissejtes tüdőrák) és HCT116 sejtsorokkal szemben is. A tesztek kimutatták, hogy az OPA az érzékeny és az ellenálló sejtsorok növekedését is gátolta 0,4 μg/ml koncentrációban. Amikor a Hs683 sejteket 0,4 μg/ml OPA-val kezelték 72 órán át, akkor gátolta a sejtek szaporodását és 24 órával a vegyület kimosása után is fennmaradt a gátlás. Az OPA-t tesztelték növekedési faktorokkal kezelt, osztódó emberi hámsejtek két típusán. A nem, vagy lassan osztódó hámsejtek esetén az OPA $IC_{50}$ értéke majdnem háromszorosa volt az osztódó hámsejtekének, és 5-10 szerese a három emberi és egy egér tumor sejtsornak. A citotoxicitási tesztek során kiderült, hogy a növényi sejtek kevésbé érzékenyek az OPA kezelésre, mint az emlős sejtsorok, továbbá, hogy a lassan vagy egyáltalán nem gyarapodó hámsejtek kevésbé érzékenyek az OPA-val szemben, mint azok, amelyek gyorsabban osztódnak (Bury és mtsi. 2013a).

De Vries-van Leeuwen és mtsi. (2010) terpén típusú vegyületek toxicitását vizsgálva megállapították, hogy az OPA mintegy 250-szer toxikusabb OVCAR3 (humán petefészek karcinóma) sejtvonalakon, mint az OPI. Nem rákos sejtvonalon (HUVEC – humán köldökvéna endotél sejtek) az OPA szintén rendkívül toxikusnak bizonyult ($IC_{50}$ 0,08 μM) szemben az OPI-vel, ami arra enged következtetni, hogy az OPA nem tumorspecifikus. Az OPI esetében jelentkező bioaktivitáshiányát a harmadik szénatomról hiányzó hidroxilcsoporttal, illetve a hetedik szénatomról hiányzó aldehid csoporttal magyarázzák, ami

összhangban van a korábbi szerkezet-hatás összefüggésekre irányuló megfigyelésekkel (Evidente és mtsi. 2006).

### *3.3.6 Az ophiobolinok HIV-1 integráz antagonista hatása*

A HIV vírus replikációjának egyik kritikus pontja a HIV-1 integráz enzim aktivitása, melyet több ophiobolin származék is képes gátolni. A leghatásosabbnak az OPC bizonyult $IC_{50}$ = 2,68 μg/ml értékkel, majd őt követték rendre az OPB ($IC_{50}$ = 8,6 μg/ml), OPK ($IC_{50}$ = 9,2 μg/ml), 6-e-OPK ($IC_{50}$ = 11,6 μg/ml), OPH ($IC_{50}$ = 12 μg/ml az 6-e-OPC ($IC_{50}$ = 13,2 μg/ml). Érdekes módon a széleskörű biológiai aktivitással rendelkező ophiobolin származék az OPA bizonyult ezen kísérletekben a legkevésbé hatékonynak $IC_{50}$ = 19,2 μg/ml értékkel (Singh és mtsi. 2003).

### *3.3.7 Az ophiobolinok in vivo hatásai*

Az ophiobolinok biológiai aktivitásának tanulmányozásakor érdemes külön figyelmet fordítani az *in vivo* kísérletekre. Nakamura és Ishibashi (1958) már a vegyületcsalád vizsgálatának korai időszakában jellemezte az akkor még egyedüli ophiobolin származékként ismert OPA hatását egereken. Megállapították az $LD_{50}$ értékeket szubkután (238 mg/kg), intraperitoneális (21 mg/kg), intravénás (12 mg/kg) és orális (73 mg/kg) adagoláskor. Érdekes módon az OPB intraperitoneális adagoláskor jóval toxikusabbnak (4,4 mg/kg) bizonyult egerekkel szemben (Ishibashi 1962).

Bury és mtsi. (2013) egér kísérletekben megállapították, hogy 10 mg/kg intraperotineális OPA kezelés hatására a túlélési periódus szignifikánsan emelkedett B16F10 melanómás egerekben a kontrollhoz képest.

A nemrég felfedezett (Yang és mtsi. 2012) OPO gátolta az MCF-7 sejtek okozta tumor növekedését kezelt egerekben. A 20 mg/kg/nap OPO kezelés hatására 69%-os gátló hatást tapasztaltak (Lv és mtsi. 2015).

Szintén egér kísérletekben sikerült kimutatni, hogy a 3-a-6-OH-OPA hatékonynak bizonyult influenza vírus A ellen 0,3 mg/kg intranazális adagolás során. A vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a vírus replikációjának gátlását a III. típusú interferonok expressziójának növelésével éri el a 3-a-6-OH-OPA. Mindezek alapján ez az ophiobolin származék egy értékes jelölt lehet új, influenza ellenes szerek fejlesztésében (Wang és mtsi. 2016).

Pósa és mtsi. (2016) az OPA gyulladásos folyamatokban betöltött szerepét vizsgálták patkányokon. Eredményeik alapján arra lehet következtetni, hogy a gyulladáskeltő mediátorok (IL-6 és TNF-α) OPA által okozott gyors felszabadulása, valamint a hem-oxigenáz enzimaktivitás csökkenése elősegíti a szisztémás gyulladást.

### *3.3.8 Az ophiobolinok hatása hímivarsejteken*

A kalmodulin antagonistaként jól ismert OPA egér spermiumokon erőteljesen gátolta a tirozin foszforilációt, gátolva ezáltal a kapacitációt (Zeng és mtsi. 2003). Megfigyelték továbbá, hogy az aktív mozgást végző ivarsejtek száma erőteljesen lecsökkent, azonban azok éltképességében nem tapasztaltak változást. Az OPA szerepét ezen folyamatokban két feltételezett szabályzó útvonallal magyarázták, miszerint vagy a sejtek mozgékonyságát gátolta először az OPA, majd azt követően a tirozin foszforilációt, vagy fordítva.

Grunewald és mtsi. (2009) hasonló megfigyeléseket tettek humán hímivarsejtek esetében. Az OPA szignifikáns mértékben gátolta a tirozin foszforilációt, valamint a spermiumok mozgékonyságát, mindezek mellett a kapacitált sejtek száma drámaian lecsökkent. Megfigyelték továbbá, hogy a kezelt spermiumok nagy részében az apoptotikus szignalizációs utvonalak erőteljesen aktiválódtak OPA kezelés hatására.

# 4 Célkitűzések

A *Bipolaris* nemzetség tagjai és más rokon fajok számos szeszterterpén típusú másodlagos metabolitot termelnek, melyekre változatos biológiai aktivitásuk miatt, mint új biotechnológiai, gyógyászati és növényvédelmi szempontból ígéretes hatóanyagokra, egyre fokozódó figyelem irányul mind az alap-, mind az alkalmazott kutatások felől. E vegyületek közül is az egyik legérdekesebb a triciklikus szeszterterpén ophiobolinok csoportja. E vegyületcsoport első képviselőit már évtizedekkel ezelőtt azonosították és több szeszterterpén termelésre képes fajt is leírtak, ugyanakkor a termelő szervezetekkel, a termelt metabolitok összetételével és mennyiségével kapcsolatos, részletesebb összehasonlító vizsgálatok eddig nem készültek. Mindezek figyelembevételével munkánk során célkitűzéseink az alábbiak voltak:

1. Az OPA és egyéb ophiobolin analógok detektálására és mennyiségi mérésére alkalmas analitikai HPLC módszer kidolgozása.
2. Az ophiobolintermelés vizsgálata különböző *Bipolaris, Curvularia és Drechslera* törzsek esetében és a kiemelkedő OPA termelést biztosító törzsek azonosítása.
3. Az OPA és egyéb ophiobolin analógok tisztítására alkalmas félpreparatív HPLC módszer kidolgozása és a vizsgálatba bevont kiemelkedő termelési képességű törzsből történő ophiobolin tisztítás megvalósítása, valamint a tisztított vegyületek tömegspektrometriás jellemzése és NMR vizsgálattal történő azonosítása.
4. A legjobb ophiobolintermelő képességgel rendelkező törzs optimális tenyésztési körülményeinek megállapítása, különös tekintettel a leoltás módjára, a tenyésztési hőmérsékletre, valamint az alkalmazott szénforrásra.
5. Az OPA stabilitásának vizsgálata szerves oldószerekben, és az esetleges bomlástermékek folyadékkromatográfiás azonosítása, valamint keletkezésük kinetikájának megállapítása.
6. A tisztított OPA biológiai aktivitásának vizsgálata emlős sejteken.

# 5 Anyagok és módszerek

## 5.1 Felhasznált anyagok

A kísérletek során felhasznált anyagokat a **2. táblázat** tartalmazza.

**2. táblázat. Felhasznált anyagok.**

| ***felhasznált anyag*** | ***gyártó*** |
|---|---|
| Acetonitril | VWR |
| Dimetil-szulfoxid | VWR |
| Etanol | VWR |
| Etil-acetát | VWR |
| Foszfát puffer | Dulbecco |
| Hangyasav | Sigma |
| Izopropanol | VWR |
| JC-1 | Molecular Probes |
| Kalcein-acetoxi-metilészter | Molecular Probes |
| Metanol | VWR |
| Metanol-$d_4$ | Sigma |
| MR-A | Kubus |
| *n*-hexán | VWR |
| Ophiobolin A | Sigma |
| Propídium-jodid | Molecular Probes |
| Resazurin | Sigma |
| RPMI-1640 | Sigma |
| Triclosan | Sigma |
| Vadkan spermium | Figen Oy Finland |
| Víz | Millipore Milli-Q Gradient A10, Merck |

## 5.2 A vizsgált izolátumok

A vizsgált izolátumokat és a származási helyüket a **3. táblázat** tartalmazza.

**3. táblázat. A vizsgált *Bipolaris, Curvularia* és *Drechslera* törzsek.**

| *Faj* | *Törzs*[1] | *Eredet* |
|---|---|---|
| *Bipolaris aberrans* | SZMC 13018 | Queensland |
| *B. bicolor* | SZMC 13038 | Ausztrália |
| *B. bicolor* | SZMC 13036 | Ausztrália |
| *B. eleusines* | SZMC 13017 | Queensland |
| *B. maydis* | SZMC 13033 | Ausztrália |
| *B. maydis* | SZMC 13035 | Ausztrália |
| *B. maydis* | SZMC 24160 | n.a. |
| *B. melinidis* | SZMC 13050 | Ausztrália |
| *B. microlaenae* | SZMC 13048 | Ausztrália |
| *B. microlaenae* | SZMC 13015 | Queensland |
| *B. oryzae* | SZMC 24161 | Ausztrália |
| *B. oryzae* | SZMC 13043 | Ausztrália |
| *B. oryzae* | SZMC 13001 | n.a. |
| *B. oryzae* | SZMC 24162 | *Oryza sativa*, gabona |
| *B. oryzae* | SZMC 24163 | n.a. |
| *B. sacchari* | SZMC 13007 | n.a. |
| *B. sorokiniana* | SZMC 13052 | Ausztrália |
| *B. sorokiniana* | SZMC 13053 | Ausztrália |
| *B. sorokiniana* | SZMC 13054 | Ausztrália |
| *B. sorokiniana* | SZMC 13013 | Olaszország |
| *B. zeicola* | SZMC 24164 | Ausztrália |
| *B. zeicola* | SZMC 24165 | n.a. |
| *Curvularia australiensis* | SZMC 13041B | *Dactyloctenium radulans*; Ausztrália |
| *C. australiensis* | SZMC 13086 | *Oryza sativa*, magok, Vietnám |
| *C. hawaiiensis* | SZMC 13046B | *Chloris gayana*; Ausztrália |
| *C. hawaiiensis* | SZMC 13085 | *Oryza sativa*, Hawaii |
| *C. homomorphus* | SZMC 24166 | Levegő, 60 m a talajszint felett |
| *C. spicifer* | SZMC 13038B | Ausztrália |
| *C. spicifera* | SZMC 13088 | *Nicotiana tabacum*, levél |
| *Drechslera nodulosa* | SZMC 13008 | n.a. |

[1]SZMC – Szeged Microbiology Collection

## 5.3 Tenyésztési körülmények

A gombatörzseket burgonyakivonatos táptalajon (PDA, 50% szűrt burgonya kivonat, 2% glükóz, 2% agar) tartottuk fenn ferde agaron.

Az izolátumok ophiobolintermelésének vizsgálatához Petri-csészén, PDA táptalajon előnevelt törzsekből steril desztillált víz segítségével konídium szuszpenziót készítettünk, mellyel 50 ml PDB tápoldatokat (50% szűrt burgonya kivonat, 2% glükóz) oltottunk le $2x10^2$ konídium/ml végkoncentrációban.

Az optimális leoltási körülmények meghatározására az előzetesen kiválasztott, PDA ferde agaron előnevelt *Bipolaris oryzae* SZMC 24163 törzsből steril desztillált víz segítségével konídium szuszpenziót készítettünk, mellyel 50-50 ml PDB tápoldatot oltottunk le három különböző végkoncentrációban (2x10, $2x10^2$ és $2x10^3$ konídium/ml). A Petri-csészén előnevelt gombából 0,5 mm átmérőjű agardugókat vágtunk ki a fiatal telep szélein, majd 50-50 ml PDB (50% szűrt burgonya kivonat, 2% glükóz) tápoldatot oltottunk le 1, 3, illetve 6 agardugóval. Az így kapott tenyészeteket 12 napig inkubáltuk 28 °C-on.

Az optimális tenyésztési hőmérséklet megállapítására az előnevelt *Bipolaris oryzae* SZMC 24163 törzset 50-50 ml PDB tápoldatba oltottuk le 2x10 konídium/ml végkoncentrációban, majd a rázatott tenyészeteket 14 napig neveltük 4 különböző hőmérsékleten (20 °C, 25 °C, 28 °C, 37 °C).

Az ophiobolinok termeléséhez az optimális szénforrás meghatározására a korábbiaknak megfelelően előnevelt *Bipolaris oryzae* SZMC 24163 törzset 50-50 ml különböző szénforrásokkal kiegészített tápoldatba (50% burgonyakivonat, 50% desztillált víz, 2% szénforrás) oltottuk le 2x10 konídium/ml végkoncentrációban. A kísérletben felhasznált szénforrások a következők voltak: glükóz, fruktóz, maltóz, szacharóz, keményítő, cellobióz, etanol, glicerin, mannitol és nátrium-acetát. A rázatott tenyészeteket 6 napig inkubáltuk 28 °C-on.

Mindegyik tenyésztési körülmény optimalizálására irányuló kísérletet 3 párhuzamosban végeztük el.

A félpreparatív munkák során az előtenyésztett *B. oryzae* SZMC 24163 törzset 1-1 l PDB tápoldatba oltottuk le 2x10 konídium/ml végkoncentrációban, majd 14 napig inkubáltuk 28 °C-on. Négy eltérő időben végeztük a leoltásokat, ennek megfelelően az egyes tenyésztések során keletkezett fermentleveket O1, O2, O3, illetve O4 sarzsokként tüntettük fel, ahol az egyes sarzsok ugyanazon konídiumszuszpenzióból kerültek leoltásra.

## 5.4 Ophiobolin kivonás

Az ophiobolintermelés felmérése és a tenyésztési körülmények vizsgálata során az ophiobolinokat folyadék-folyadék extrakció segítségével vontuk ki a fermentléből. A tenyésztési időszak alatt naponta 1 ml fermentlé került mintavételezésre, majd ezt követően a micélium törmeléket centrifugálással ülepítettük (13 000 rpm, 3 perc). A felülúszó 0,5 ml-ét azonos mennyiségű etil-acetáttal három lépésben extraháltuk, majd az egyesített felső szerves fázisokat nitrogén gázáram alatt szárazra pároltuk. A mintákat a HPLC-s vizsgálatokig -20 °C-on tároltuk. Az analízis előtt a bepárolt mintákat 500 µl HPLC tisztaságú acetonitrilben oldottuk vissza.

A szénforrás optimalizálására irányuló kísérletek során végpontos mérést végeztünk a tenyésztési időszak végén. A micéliumokat szűrtük, majd 24 órás szárítást (70 °C) követően tömegüket megmértük (Ohaus Explorer, VWR).

Az ophiobolinok tisztítására irányuló kísérletek során a fermentlevet szűrtűk, majd 1:1 térfogat arányban etil-acetáttal extraháltuk. A folyadék-folyadék extrakciót háromszor ismételtük, és az egyes extraktumok egyesítését követően rotációs vákuumbepárló készülék (IKA RV 10, IKA Works) segítségével szárazra pároltuk. Az így keletkezett szárazanyag tömegét megmértük.

## 5.5 Ophiobolinok analitikai HPLC vizsgálata

### *5.5.1 Az OPA termelésének vizsgálatára alkalmazott HPLC módszer*

Az OPA termelésének vizsgálatára, a termelési kinetikák megállapítására az alábbiakban részletezett, általunk kifejlesztett analitikai HPLC módszert alkalmaztuk. A vizsgálatok során moduláris Shimadzu-típusú nagynyomású gradiensképző HPLC rendszert alkalmaztunk, melynek vezérlését egy SCL-10AVP vezérlőegység végezte, amihez két LC-20AD pumpa, egy DGU-14A gáztalanító, egy SIL-10ADVP automata mintaadagoló, egy CTO-10ASVP oszlop termosztát, valamint egy SPD-10AVP kétcsatornás UV-Vis detektor kapcsolódott optikai kábeleken keresztül. Az OPA detektálását és mennyiségi meghatározását C18 4 × 3 mm (Phenomenex) előtétoszloppal ellátott Prodigy C18 150 × 4,6 mm, 3 µm (Phenomenex) oszlopon valósítottuk meg HPLC tisztaságú víz és acetonitril (40:60) arányú elegye segítségével. Az áramlási sebesség és az injektálási térfogat rendre 1 ml/min és 3 µl

volt. A detektálási hullámhossz 230 nm, illetve 254 nm, míg az oszlop termosztát hőmérséklete 40 °C volt. A módszer kifejlesztéséhez, illetve a kalibrációhoz standardként a kereskedelmi forgalomban kapható OPA-t használtunk. Az adatgyűjtést és a kiértékelést a ClassVP v5.2 programmal valósítottuk meg.

### *5.5.2 Az ophiobolintermelés optimalizálására alkalmazott HPLC módszer*

A termelés optimalizálására irányuló kísérletek során az alábbiakban tárgyalt analitikai HPLC módszert alkalmaztuk. Az OPA detektálására és mennyiségi meghatározására izokratikus HPLC módszert fejlesztettünk ki, ahol az eluens HPLC tisztaságú víz és acetonitril (40:60) volt Prodigy C18 150 x 4,6 mm, 3 μm (Phenomenex) oszlopon C18 3 x 4 mm (Phenomenex) előtétoszlop használatával. A vizsgálatok során moduláris Shimadzu típusú nagynyomású gradiensképző HPLC rendszert alkalmaztunk. A rendszer vezérlését CBM-20A vezérlőegység végezte, amelyhez SIL-20A automata mintaadagoló, két LC-20AD pumpa, DGU-14A gáztalanító, CTO-10ASVP oszlop termosztát, valamint egy SPD-10AVP UV-Vis detektor (Shimadzu) kapcsolódott optikai kábeleken keresztül. Az áramlási sebesség 1 ml/min volt, 3 μl injektálási térfogat mellett. A detektálási hullámhossz 230 nm, illetve 254 nm, míg az oszlop termosztát hőmérséklete 40 °C volt. A módszer kifejlesztéséhez standardként a kereskedelmi forgalomban kapható OPA-t használtunk. Az adatgyűjtést és a kiértékelést a ClassVP v5.2 programmal végeztük.

### *5.5.3 Az OPA bomlásának vizsgálatára alkalmazott HPLC módszer*

Az OPA bomlásának vizsgálatára alkalmazott izokratikus HPLC módszer az **5.5.2 fejezet**ben részletezett analitikai módszer kis módosításával került megvalósításra. Az elválasztást Kinetex C18 100 x 4,6 mm, 2,6 μm (Phenomenex) analitikai HPLC oszlopon hajtottuk végre. Eluensként MeCN és víz (1:1) arányú elegyét alkalmaztuk 0,5 ml/min áramlási sebesség mellett. Az injektált minta mennyisége 3 μl volt. A detektálást 230 nm és 254 nm hullámhosszakon végeztük. Az adatgyűjtés, valamint kiértékelés ClassVP v5.2 programmal történt.

### *5.5.4 Az O1 sarzsból nyert frakciók tisztaságának vizsgálatára alkalmazott HPLC módszer*

Az O1 sarzs frakcióinak összetételét az **5.5.1** fejezetben részletezett analitikai módszer módosításával hajtottuk végre. Az elválasztást MeCN:$H_2O$ (1:1) arányú elegyével végeztük Prodigy C18 250 mm x 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex) oszlopon, melyet C18 4 x 3 mm előtétoszloppal (Phenomenex) láttunk el.

### *5.5.5 Az O2, O3, O4 sarzsokból nyert frakciók tisztaságának vizsgálatára alkalmazott HPLC módszer*

Az egyes frakciók tisztaságának ellenőrzését egy Waters 515 HPLC pumpából és egy Waters 2487 kétcsatornás UV-VIS detektorból álló moduláris HPLC készülékkel hajtottuk végre. A tisztított vegyületek elválasztását Prodigy C18 150 x 4,6 mm, 3 µm (Phenomenex) HPLC oszlopon valósítottuk meg MeCN:$H_2O$ 60:40 arányú elegyét használva eluensként 1 ml/min áramlási sebesség mellett, kézi injektorral (Rheodyne 7725i) 5 µl-t injektálva. A detektálási hullámhossz 230 nm volt. Az adatgyűjtést és értékelést ClassVP v6.14 szoftverrel végeztük.

## 5.6 Az ophiobolin molekulák tisztítása

### *5.6.1 Az O1 sarzs félpreparatív tisztítása*

#### *5.6.1.1 A normál fázisú félpreparatív HPLC tisztítás*

Az ophiobolin származékok tisztítására alkalmazott normál fázisú félpreparatív eljárást K-1000 kvaterner pumpával (Knauer) és Fractomax FR5 (Pharmacia) frakciószedő berendezéssel valósítottuk meg. Az elválasztás során ECO 15/450V3K üvegoszlopot (15 x 450 mm) (Kronlab) használtunk, mely 10-40 µm szemcseátmérőjű Kieselgel 60 (Merck) állófázissal töltöttünk. Eluensként etil-acetát:*n*-hexán (1:1) elegyét alkalmaztuk 2 ml/min áramlási sebesség mellett. A frakciószedést Fractomax FR5 frakciószedő készülékkel valósítottuk meg, ahol az egyes frakciókat 4-4 ml térfogatban gyűjtöttük.

#### *5.6.1.2 A fordított fázisú félpreparatív HPLC tisztítás*

A tisztítás második és harmadik lépéseként fordított fázisú HPLC módszert alkalmaztunk, SERVA HPLC ODS (5µm) álló fázis felhasználásával. Az áramlási sebesség mindkét esetben 3 ml/min volt. Az elválasztáshoz acetonitril:víz eluensek izokratikus elegyét alkalmaztuk (7:3), illetve (1:1) arányok mellett. A detektálás mindkét esetben 230 és 300 nm hullámhosszon történt és az injektált térfogat 200 µl volt. Az egyes frakciók gyűjtését a detektorjel alapján kézzel valósítottuk meg, ügyelve arra, hogy az elválasztani kívánt anyagok a lehető legnagyobb tisztaságban kerüljenek frakcionálásra.

### *5.6.2 Az O2, O3 és O4 sarzsok félpreparatív tisztítása*

A sarzsok tisztítására félpreparatív HPLC rendszert alkalmaztunk, mely egy SPD-10AVP UV-VIS detektorból, egy LC-10ADVP pumpából, egy FCV-10ALVP grádienskeverőből, egy SCL-10AVP vezérlőegységből (Shimadzu), valamint egy K-5004 (Knauer) gáztalanítóból állt. A minták injektálását kézi mintaadagolóval (Rheodyne 7725i) valósítottuk meg. A tisztítási munkák során 5 fordított fázisú félpreparatív módszert alkalmaztunk (**4. táblázat**), melyek közül az RP-4 jelű, eltérően a többitől, oldószergrádiens segítségével valósította meg az elválasztást (**5. táblázat**), míg az RP-1, RP-2, RP-2a és az RP-3 módszer izokratikus volt.

A frakciószedést manuálisan végeztük a detektorjel alapján, ügyelve arra, hogy a legkisebb anyagveszteség mellett a lehető legtisztább anyagot kapjuk.

**4. táblázat. Az O2, O3 és O4 sarzsok tisztításához felhasznált fordított fázisú félpreparatív módszerek.**

| *Módszer* | *Áramlási sebesség (ml/min)* | *Oldószer arány $H_2O$:MeCN* | *Oszlop* | *Futási idő (perc)* |
|---|---|---|---|---|
| **RP-1** | 3 | 50:50 | BioBasic-18 250 x 10 mm 5µ | 40 |
| **RP-2** | 3 | 50:50 | Serva D6900 | 55 |
| **RP-2a** | 3 | 50:50 | Serva D6900 | 60 |
| **RP-3** | 3 | 60:40 | Serva D6900 | 110 |
| **RP-4** | 3 | gradiens | Serva D6900 | 100 |

**5. táblázat. Az RP-4 módszer oldószergrádiens programja.**

| *Idő (perc)* | *B (MeCN%)* |
|---|---|
| 0,01 | 40 |
| 70 | 40 |
| 71 | 80 |
| 85 | 80 |
| 85,5 | 40 |
| 100 | 40 |

## 5.7 Azonosítás, szerkezetvizsgálat

### *5.7.1 Ophiobolin származékok molekulatömegének tömegspektrometriás meghatározása*

A félpreparatív tisztítások során nyert potenciális ophiobolin származékok molekulatömegének meghatározására Shimadzu HPLC-MS (Shimadzu) készüléket használtunk, mely egy LC-10ADVP pumpából, egy DGU-14A gáztalanítóból, egy CTO-10ASVP oszloptermosztátból, egy SIL-10ADVP automata mintaadagolóból, egy SPD-M10AVP diódasoros detektorból, egy SCL-10AVP vezérlőegységből, valamint egy LCMS-2010A egyszeres kvadrupól tömegspektrométerből állt. A mintakomponensek elválasztását Phenomenex Prodigy C18 100 x 2 mm, 3 µm (Gen-Lab) oszlopon valósítottuk meg MeCN + 0,1% HCOOH és $H_2O$ + 0,1% HCOOH 1:1 arányú elegyét alkalmazva eluensként 0,2 ml/min áramlási sebesség mellett. Az oszloptermosztát hőmérséklete, valamint az injektálási térfogat rendre 40 °C és 3 µl voltak. A tömegspektrometriás paramétereket az **6. táblázat** foglalja össze.

**6. táblázat. A tisztított vegyületek molekulatömegének meghatározására használt módszer tömegspektrometriás paraméterei.**

| *Megnevezés* | *Paraméter* | *Megnevezés* | *Paraméter* |
|---|---|---|---|
| Ionforrás | ESI | Interface feszültség | 4,5 kV |
| Ionizáció módja | pozitív | Nebulizer gáz | $N_2$ |
| Analizátor mód | SCAN | Nebulizer gáz áramlási sebesség | 1,5 l/perc |
| Analizátor tartomány | *m/z* 350 – 450 | Heath block hőmérséklet | 200 °C |
| Event time | 1 sec | CDL hőmérséklet | 250 °C |
| Detektor feszültség | 1,5 kV | | |

### *5.7.2 NMR mérések*

Az általunk tisztított ophiobolin származékok szerkezetvizsgálata a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszeranalitikai Intézetében történt.

$^{1}$H NMR, $^{1}$H-$^{1}$H COSY és HMBC spektrumok felvételét MeOD-ban Bruker Avance DRX 500 spektrométer (Bruker Biospin GmbH) segítségével végeztük el 500 MHz ($^{1}$H) és 125 MHz ($^{13}$C) értékeken. JMOD, HSQC és NOESY méréseket Bruker Ultrashield Plus 600 spektrométer (Bruker Biospin GmbH) segítségével valósítottuk meg 600 MHz ($^{1}$H) és 150 MHz ($^{13}$C) értékeken oldószerjeleket használva referenciaként (MeOD: δH 3.31/δC 47.6). A HSQC és HMBC vizsgálatokat rendre 145.0 és 8.0 Hz értékeken optimalizáltuk. A kétdimenziós adatok gyűjtését és kiértékelését Bruker Topspin 3.0 szoftver (Bruker Biospin GmbH) használatával végeztük el.

## 5.8 Az OPA stabilitásának vizsgálata

Az OPA szerves oldószerekben történő bomlásának vizsgálatához 50-50 µg általunk tisztított OPA-t oldottunk fel 500-500 µl szerves oldószerben (MeCN, MeOH, DMSO, EtOH, EtOAc és IPA), így az egyes oldatok végkoncentrációja OPA-ra nézve 100 µg/ml volt. Három különböző tárolási hőmérsékleten (-20 °C, 4 °C és 25 °C) vizsgáltuk az OPA bomlását napi mérésekkel. Az analitikai méréseket az **5.5.3 fejezet**ben tárgyalt módszerrel valósítottuk meg. Minden mérési kísérletet három párhuzamosban végeztünk el.

## 5.9 Biológiai hatásvizsgálatok

### *5.9.1 Hímivarsejt mozgékonyság gátlás vizsgálata*

A kísérleteket Andersson és mtsi. (2010) munkája alapján végeztük el. A vizsgálatokban használt vadkan spermiumot (27 x $10^{6}$ sejt/ml) a Figen Oy Finland biztosította. A tisztított OPA-ból a rövid és hosszú idejű kezelésekre két külön 4-4 lépcsős hígítási sorozatot készítettünk. A rövid idejű kezeléseknél az OPA koncentrációja 2500 µg/ml - 250 µg/ml tartományban volt, míg a hosszú idejű vizsgálatokban ez a koncentráció tartomány 50 µg/ml-től 5 µg/ml-ig terjedt. Mindegyik hígításból 20 µl-t pipettáztunk 2 ml MR-A tápoldattal hígított spermiumhoz, megközelítőleg 100-szoros hígulást érve el ezzel az eredeti hatóanyag

koncentrációban. Kontrolként 20 µl metanolt alkalmaztunk. A rövid és hosszú idejű vizsgálatokban a mintákat 30 percig, illetve 24 óráig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő letelte után a spermiumok mozgékonyságát egy rövid ideig tartó inkubálással indukáltuk (37 °C, 5 perc), mely során a mintákat folyamatosan ráztuk, biztosítva a megfelelő oxigénellátottságot a spermiumok számára. A mozgékonyságot fáziskontraszt mikroszkóp (Olympus CKX4, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH) segítségével vizsgáltuk célszoftver alkalmazásával (Software CellSens standard version 11.0.06, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH) megbecsülve az aktív farokcsapkodást prezentáló ivarsejtek arányát. Szabad szemmel az aktív mozgást végző hímivarsejtek azonosítása a farki részük alapján történt, mely a látómezőben, mint két egymással szöget bezáró farki rész látható. Az aktív mozgást végző spermiumoknak azokat fogadtuk el, melyeknél a farokcsapkodás látótérben detektálható szöge legalább 40°-os szöget mutatott. Ezen ivarsejtek mennyiségét a szoftver segítségével határoztuk meg. Mindegyik kísérletet háromszor ismételtük.

A toxicitás az OPA oldat koncentrációjának végpontjaként került megállapításra, ahol a spermiumok kevesebb, mint 50%-a mutatott gyors mozgást. A vizsgálat (24 órás expozíció) kalibrálására triclosant alkalmaztunk 10 párhuzamos tesztben, az $EC_{50}$ érték 1 µg/ml volt (SD ±0,2). Bár viszonylag kevés szakirodalmi utalás található a triclosan vadkan spermiumok mozgékonyságát gátló hatásáról (Andersson és mtsi. 2010, Rasimus és mtsi. 2012), azonban a rendelkezésre álló adatok alapján kijelenthető, hogy ez a vegyület remekül alkalmazható referencia toxinként.

### *5.9.2 Hímivarsejt mozgékonyság gátlás vizsgálat validálása*

Az **5.9.1 fejezet**ben lévő szubjektív motilitási vizsgálatot automata Hamilton Throna spermium motilitásvizsgáló készülékkel (HTM-S, ver. 7.2; Hamilton-Thorn Research) validáltuk. Kétszáz, standard motilitásgátló anyaggal kezelt vadkanspermium-mintát vizsgáltunk mind a szubjektív módszerrel, mind pedig az automata motilitásanalizátorral. A vizsgált spermiumok közül 73 db mutatott 50%-os csökkenést a mozgásban. Egyik módszer alkalmazása során sem tapasztaltunk csökkenést a farok csapkodásban vagy a mozgásban 125 minta esetén. Két minta mutatott gyenge csökkenést a gyors mozgásban a motilitásanalizátorral történő vizsgálat eredményeként, míg a szubjektív motilitási vizsgálat során nem tapasztaltunk gyengülést. Ennél fogva a spermiumok farok csapkodásának megállapítására szolgáló módszer, mint a motilitás gátlásának mérési módszere 99%-os

hasonlóságot mutatott a gyorsan mozgó spermiumok vizsgálatára szolgáló Hamilton Thron spermium motilitásvizsgáló készülékkel mért adatokkal.

### *5.9.3 Sejtmembrán-permeabilitási vizsgálat*

A gyors hatásvizsgálatok elvégzésekor mozgékony ivarsejteket festettünk propídium-jodiddal (PI), mely során a spermiumokat rövid ideig tartó 37 °C-on történő rázatással indukáltuk. A vizsgálathoz 150 µl MR-A tápoldattal hígított vadkan hímivarsejtet (2,7 x $10^7$ sejt/ml) pipettáztunk mikrotiter lemezre. A tesztanyagból hatpontos hígítási sort készítettünk 200 ng/ml – 4 µg/ml tartományt felölelő végkoncetrációkban, melyekből 20 µl-t a hímivarsejtekhez adtunk. Kontrolként itt is metanolt alkalmaztunk. A mintákat 2 órán át 37 °C-on inkubáltuk folyamatos rázatás mellett (Innova 5000, New Brunswick Scientific) 160 rpm fordulatszámon. Ezt követően 1 ml PI oldatot (1 mg/ml Dulbecco foszfát puffer – 2,7 mM KCl, 1,5 mM $KH_2PO_4$, 136,9 mM NaCl, 8,9 mM $Na_2HPO_4*7H_2O$) pipettáztunk 3 ml foszfát-pufferhez. Ebből az oldatból 150 µl-t adtunk az OPA-val előkezelt ivarsejtekhez, majd a mintákat 15 percre sötétbe helyeztük (37 °C). A második inkubációs periódust követően a mintákat fluoreszcens mikrotiterlemez leolvasó (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific) segítségével elemeztük 544 nm excitációs és 600 nm emissziós hullámhossz mellett. A plazmamembrán-integritás változásának vizsgálatára fagyasztott ivarsejteket alkalmaztunk (100% letalitás) pozitív kontrolként, míg a negatív kontrol (0% letalitás) csak foszfát puffert tartalmazott. A minták életképességének csökkenését Alm és mtsi. (2001) munkája alapján számítottuk. A kísérletet triclosannal kalibráltuk, ahol az öt párhuzamos mérés során az $EC_{50}$ 2 µg/ml-nek bizonyult (SD ± 0.6).

A hosszú idejű hatásvizsgálatok esetében (1 nap) a kezeléseket szobahőmérsékleten végeztük, mert 37 °C-on a spermiumok maximum 1 h-ig élnek. A spermiumok szobahőmérsékleten azonban nem mozgékonyak. A szobahőmérsékleten végzett sejtmembrán permeabilitási vizsgálat ezért statikus spermium sejteken történt PI és kalcein-acetoxi-metilészter (CAM) kettős festéssel Hoornstra és mtsi. (2003) alapján. A DMSO-val készített, 1 mg/ml koncentrációjú CAM 5 µl-ét 895 ml spermium tápoldattal elegyítettük. Az elegy 100 µl-éhez 1 µl, DMSO-val készített 1 mg/ml koncentrációjú PI oldatot adtunk és ehhez adtuk hozzá a 100 µl tesztanyaggal kezelt hímivarsejt szuszpenziót. A festékkel kevert ivarsejteket ezután a gyors vizsgálathoz hasonlóan 15 percig sötétben 37 °C-on inkubáltuk, majd a minták fluoreszcenciáját mértük 544 nm excitációs és 600 nm emissziós hullámhossz (PI), valamint 490 nm excitációs és 520 nm emissziós hullámhossz (CAM) mellett. Az alkalmazott

tesztanyag koncentrációk és a kezelés menete a fentiekben tárgyalt rövid inkubációs idejű vizsgálatokkal megegyezően történtek.

A vizsgálatokat (PI, PI + CAM festés) három párhuzamosban végeztünk el, és mind a rövid inkubációs idejű, mint pedig a statikus vizsgálatok esetében a permeabilitás változást epifluoreszcens mikroszkóppal is követtük (Eclipse E600, Nikon).

### *5.9.4 A mitokondriumdepolarizációs hatás vizsgálata*

A mitokondriumdepolarizációt, statikus sejteken, szobahőmérsékleten a mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$) függő 5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazolo-karbocianin jodid (JC-1) festékkel vizsgáltuk Hoornstra és mtsi. (2003) alapján apróbb változtatások mellett. OPA-val 200 µl ivarsejtet kezeltünk 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,5 µg/ml és 0,125 µg/ml koncentráció szintekben, és a mintákat 37 °C-on 2 percig inkubáltuk, majd 0,3 µl DMSO-ban oldott (1 mg/ml) JC-1 festéket adtunk hozzá. Ezt követően újabb inkubálás következett 37 °C-on 2 percig. A sejtek vizsgálatát epifluoreszcens mikroszkóppal végeztük el (Eclipse E600, Nikon). A vizsgálatot három párhuzamosban végeztünk el és minden minta esetében 5 mikroszkópos látótér került elemzésre, melyek egyenként hozzávetőlegesen 20 sejtet tartalmaztak.

### *5.9.5 Emlős szomatikus sejt citotoxicitás vizsgálat*

A citotoxicitási vizsgálatokba embrionális macska tüdő (feline fetus lung cells, FFL) (Andersson és mtsi. 2009), egér neuroblasztóma (Mouse neuroblastoma cells, MNA) (Kulonen és mtsi. 1991) és sertés vesetubuláris epiteliális (porcine kidney tubular epithelial cell line, PK-15) (Rasimus és mtsi. 2012) sejtvonalakat vontunk be. A sejtvonalakat 95% levegő, 5% $CO_2$ jelenlétében tartottuk fenn, 95% relatív páratartalom mellett 37 °C-on RPMI 1640 tápoldatban, egy Heracell 150i $CO_2$ inkubátorban (Thermo Fisher Scientific). A leválasztott sejteket 96 lyukú mikrotiter lemezre vittük és metanolban oldott tisztított OPA-val kezeltük. A végkoncentrációk 48,8 ng/ml-től 25 µg/ml-ig változtak 10 lépcsőben. A mintákat 24 órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd fáziskontraszt mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a sejtosztódásgátlást. Az $EC_{50}$ értékek pontos meghatározására festéses eljárást alkalmaztunk. Az ophiobolinnal kezelt mintákat három napig 37 °C-on inkubáltuk, majd 10 µl fiziológiás sóoldatban oldott (400 µg/ml) resazurint adtunk hozzá és további két órát inkubáltuk

ugyanazon körülmények között, majd mikrotiterlemez olvasó (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific) segítségével elemeztük 544 nm extinkciós és 590 nm emissziós hullámhosszakon. Mindegyik toxicitási vizsgálatot háromszor ismételtük. A mérést triclosannal kalibráltuk, az $EC_{50}$ érték 10 párhuzamosban 9,4 µg/ml-nek bizonyult. A toxicitást azon a legalacsonyabb koncentráció értékkel fejeztük ki, ahol az élő sejtek aránya kevesebb, mint 50% ($EC_{50}$) volt.

## 5.10 Számítási módszerek, statisztikai elemzések

### *5.10.1 Kromatográfiás paraméterek meghatározása*

#### *5.10.1.1 Rendszeralkalmasság*

Rendszeralkalmassági vizsgálat során különböző elválasztási paraméterek meghatározását végeztük el úgy, mint retenciós idő ($t_R$), relatív retenciós idő ($r_G$), kapacitás faktor (k'), felbontás ($R_S$), szimmetria faktor ($A_S$), félértékszélesség ($W_h$), valamint elméleti tányérszám (N). A vizsgálat során ismert koncentrációjú standard oldatot injektáltunk, majd az egyes rendszeralkalmassági paramétereket szoftveres kiértékeléssel határoztuk meg. Az elválasztási paraméterek elfogadási feltételei a következők voltak: k'> 4; $R_s$> 1,45; 1,60> $A_s$> 0,75; N> 5000.

A vizsgálatban szereplő paraméterek számításai:

Relatív retenciós idő:

$$r_G = \frac{t_{R_{OPA}}}{t_{R_i}}$$

Kapacitás faktor:

$$k' = \frac{t_{R_i} - t_{R_0}}{t_{R_0}}$$

Felbontás:

$$R_S = \frac{t'_{R_2} - t'_{R_1}}{\frac{W_2 + W_1}{2}}$$

Szimmetria faktor:

$$A_S = \frac{AW_{0,05} - BW_{0,05}}{2AW_{0,05}}$$

Elméleti tányérszám:

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_h} \right)^2$$

Ahol:

| | | |
|---|---|---|
| $t_R$ | = | retenciós idő |
| $t_{ROPA}$ | = | OPA retenciós ideje |
| $t_{Ri}$ | = | adott vegyület retenciós ideje |
| $t_{R0}$ | = | holtidő |
| $t_{R1}$, $t_{R2}$ | = | két egymás mellett eluálódó vegyület retenciós ideje |
| $W_h$ | = | a csúcsmagasság felénél mért csúcsszélesség |
| $AW_{0,05}$ | = | a csúcsmagasság 5%-ánál mért jobboldali csúcsszélesség |
| $BW_{0,05}$ | = | a csúcsmagasság 5%-ánál mért baloldali csúcsszélesség |

#### *5.10.1.2 Linearitás*

Az ophiobolinok analitikai vizsgálata során az egyes ophiobolin származékokból kalibrációs oldatsorozatot készítettünk és az adott analitikai HPLC módszerrel lemértük. A kapott pontokra minden esetben egyenest illesztettünk és meghatároztuk annak egyenletét, valamint korrelációs koefficiens értékét. A linearitás elfogadásának feltételeként megszabtuk, hogy a korrelációs koefficiens értéke nagyobb legyen, mint 0,995, valamint az egyenes egyenletével történő visszaszámolás során a kalibráció legalsó pontja legfeljebb ±25%-kal, míg a többi pont legfeljebb ±15%-kal térjen el a bemért koncentrációtól.

#### *5.10.1.3 Rendszerpontosság*

A rendszerpontosság megállapítását a kalibrációs tartományon belül eső, ismert koncentrációjú oldat háromszori injektálásával valósítottuk meg. A módszer elfogadásának feltételét a csúcs alatti területekre számított RSD % értékét <10%-ban állapítottuk meg, míg a retenciós idő esetében ez a küszöbérték 1% volt.

### *5.10.2 A félpreparatív tisztítások során alkalmazott kalkulációk*

#### *5.10.2.1 Tisztaság*

Az ophiobolinok félpreparatív tisztítása során az egyes frakciók tisztaságát a csúcs alatti terület százalékos formájában adtuk meg, melyet az adott módszerhez alkalmazott kromatográfiás szoftver segítségével állapítottuk meg.

### *5.10.3 A tenyésztési körülmények optimalizálásának statisztikai elemzései*

A statisztikai elemzését a GraphPad Prism version 5.01 for Windows (GraphPad Software) szoftver segítségével valósítottuk meg. A leoltási körülmények, valamint a tenyésztési hőmérséklet optimalizálása során az egyes paraméterek által, az ophiobolintermelésben keltett szignifikáns különbségeket párosítatlan t-próbával határoztuk meg. A szénforrások ophiobolintermelésre gyakorolt hatásának vizsgálata során a szignifikáns különbségeket az eltérő szénforrások és a kontrolként alkalmazott glükóz között egyutas varianciaanalízissel állapítottuk meg Bonferroni többszörös összehasonlító utóteszttel.

### *5.10.4 Biológiai hatásvizsgálatok statisztikai elemzései*

A statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism version 5.01 for Windows (GraphPad Software) szoftver segítségével valósítottuk meg. A szignifikáns különbségeket az eltérő koncentrációjú OPA-val kezelt sejtek életképessége és a hozzájuk tartozó kontrol minták között egyutas varianciaanalízissel állapítottuk meg Bonferroni többszörös összehasonlító utóteszttel.

# 6 Eredmények és értékelés

## 6.1 Kromatográfiás paraméterek meghatározása

Az ophiobolinok analitikai vizsgálata során elvégeztük az egyes módszerek kromatográfiás paramétereinek meghatározását, különös tekintettel a rendszeralkalmassági paraméterekre, a linearitásra, valamint a rendszerpontosságra.

Az általunk kifejlesztett HPLC módszerek rendszeralkalmassági paraméterei minden támasztott követelménynek (**5.10.1.1 fejezet**) megfeleltek (**1, 5, 9, 13, 17 Mellékletek**).

A linearitás vizsgálata során elvégeztük az egyes vegyületek kalibrációit (**2, 6, 10, 14, 18 Mellékletek**). A kalibrációs egyenesek egyenleteit és a korrelációs koefficiens értékeket a **7. táblázat** tartalmazza.

**7. táblázat. Az analitikai HPLC módszerek kalibrációs egyeneseinek egyenletei.**

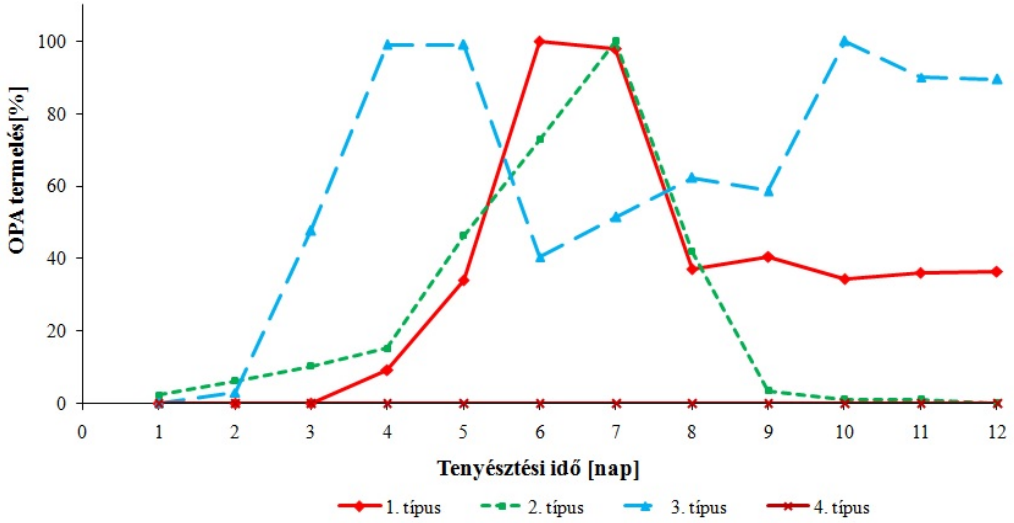
| *Módszer* | *Vegyület* | *Egyenlet* | $R^2$ |
|---|---|---|---|
| **OPA termelésének tanulmányozása** | OPA | $y = 1{,}5715*10^{-4}\,x + 0{,}0840$ | 0,9999 |
| **Optimális tenyésztési körülmények tanulmányozása** | OPA | $y = 2{,}7625*10^{-4}\,x + 0{,}9401$ | 0,9998 |
| | 6-e-OPA | $y = 2{,}2419*10^{-4}\,x + 0{,}9608$ | 0,9999 |
| | OPI | $y = 2{,}3919*10^{-4}\,x + 0{,}2809$ | 0,9999 |
| | 3-a-OPA | $y = 1{,}0309*10^{-4}\,x + 0{,}8422$ | 0,9999 |
| | 3-a-6-e-OPA | $y = 1{,}3507*10^{-4}\,x + 0{,}7366$ | 0,9999 |
| **OPA stabilitásának vizsgálata** | OPA | $y = 1{,}8499*10^{-4}\,x + 0{,}4232$ | 0,9997 |
| | 6-e-OPA | $y = 1{,}5065*10^{-4}\,x + 0{,}3392$ | 0,99967 |
| | OPI | $y = 1{,}6167*10^{-4}\,x - 0{,}0721$ | 0,9999 |
| | 3-a-OPA | $y = 6{,}9053*10^{-5}\,x - 0{,}0036$ | 0,9999 |
| | 3-a-6-e-OPA | $y = 9{,}0775*10^{-5}\,x – 0{,}0296$ | 0,9999 |
| **O1 sarzs tisztítása** | OPA | $y = 4{,}0208*10^{-4}\,x – 7{,}6877$ | 0,9999 |
| **O2, O3, O4 sarzs tisztítása** | OPA | $y = 8{,}1042*10^{-2}\,x – 4{,}1857$ | 0,9988 |
| | 6-e-OPA | $y = 6{,}4110*10^{-2}\,x + 1{,}8581$ | 0,9992 |
| | OPI | $y = 6{,}6928\,*10^{-2}\,x – 2{,}8172$ | 0,9992 |
| | 3-a-OPA | $y = 2{,}9435*10^{-2}\,x – 3{,}1593$ | 0,9988 |
| | 3-a-6-e-OPA | $y = 3{,}9107*10^{-2}\,x – 15{,}4412$ | 0,9994 |

Az egyes analitikai módszerek linearitásának vizsgálata során ellenőriztük az adott módszernél alkalmazott kalibrációs egyenesek pontosságát (**3, 7, 11, 15, 19 Mellékletek**). A kalibráció során a kalibrációs pontokra kapott csúcs alatti területek, valamint az egyenesek egyenletei segítségével kiszámítottuk az egyes kalibrációs pontokhoz tartozó koncentráció értékeket, majd megállapítottuk a bemért koncentrációktól való eltéréseiket. Az eltérések egyik esetben sem haladták meg a legalsó pontra vonatkozó ± 25%-os, illetve a többi pontra vonatkozó ± 15%-os küszöbértéket.

Az analitikai HPLC módszerek rendszerpontosságának vizsgálatát az adott módszer kalibrációjának lineáris tartományába eső standard oldat háromszori injektálásával valósítottuk meg. A kapott eredmények kiértékelése során kiszámítottuk az egyes csúcsok retenciós ideinek és csúcs alatti terület értékeinek szórását, valamint RSD % értékét. A vizsgálatba bevont ophiobolin származékok esetében mind a csúcs alatti területek, mind pedig a retenciós idők RSD % értékei a felállított határértékek alattinak bizonyultak (csúcs alatti terület$_{RSD\%}$<10%; $t_{R,RSD\%}$<1%) (**4, 8, 12, 16, 20 Mellékletek**).

## 6.2 Ophiobolinok termelési kinetikája

Az OPA termelési kinetikáját 30 *Bipolaris*, *Curvularia* és *Dreschlera* törzs esetében vizsgáltuk 12 napos tenyésztési időszakban. A HPLC mérések alapján a vizsgált törzsek négy csoportba sorolhatók (**6. ábra**).




**6. ábra. A vizsgált izolátumok OPA termelési kinetikái, ahol az adott típusok 1-1 példa útján kerültek bemutatásra. 1. típus: *B. oryzae* SZMC 24163, 2. típus: *C. hawaiiensis* SZMC 13046B, 3 típus: *B. sacchari* SZMC 13007, 4. típus: *B. oryzae* SZMC 13001.**

Az első szekréciós mintázat (1. típus) esetén az OPA termelés egy maximum értéket mutatott, majd az ezt követő tenyésztési időszak során a termelt OPA mennyisége lecsökkent és egy konstans szinten maradt. Az 1. típusú termelési kinetikát mutató törzsek esetében a legmagasabb OPA szintet a tenyésztési periódus ötödik és nyolcadik napja között lehetett megfigyelni. Ez alól csak a *B. maydis* SZMC 13033 jelű törzse képzett kivételt, melynek termelési maximuma a tenyésztés 12. napján jelentkezett. A második csoport (2. típus) esetén a termelt OPA mennyisége az 4-7. napon érte el maximumát, majd nagymértékű csökkenést figyeltünk meg és a tenyésztési időszaki további részében nem volt detektálható mennyiségű OPA a fermentlevekben. A harmadik (3. típus) csoport tagjai esetében az OPA szekréciós profil két maximumos értéket mutatott a vizsgált tenyésztési időszak alatt, melyek általában a 3-5. és a 9-10. napokon jelentkeztek. Ezen típusban a két megfigyelt OPA maximum közel azonos volt. A kinetikai vizsgálatokba bevont törzsek közül az 1. típus tagjai voltak a legnagyobb számban (43%), míg a 2. típus a vizsgált mikrobák 17%-át tartalmazta, a 3-as csoportot csupán 3 izolátum jellemezte (**8. táblázat**). A vizsgált törzsek 30%-a nem bizonyult OPA termelőnek (4. típus) az alkalmazott tenyésztési körülmények között.

Az öt vizsgált *B. oryzae* törzs közül két esetében figyelhettünk meg kiemelkedő mennyiségű termelt OPA-t és az öt törzs két különböző kinetikai típusba tartozott (**8. táblázat**). Hasonló megfigyelést lehetett tenni a *B. bicolor* két vizsgált törzse esetében is, ahol a SZMC 13038jelű törzs az 1. típusba, míg a SZMC 13036 a 4. típusba tartozott, azonban mindketten igen alacsony OPA mennyiséget termeltek. A *B. maydis* vizsgálatba bevont törzsei szintén két eltérő termelési kinetikájú csoportba sorolhatók, azonban a SZMC 13033 jelű törzs közel hússzor nagyobb mennyiségben termelt OPA-t, mint a SZMC 13035. A *B. sorokiniana* vizsgálatba bevont törzsei közül egy tartozik a 3. típusba, míg kettő a 2. típusba és egy a 4. típusba, azonban egyikük sem mutat kiemelkedő OPA termelést. Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy az ophiobolintermelő-képesség nem faj-, hanem törzs-specifikus tulajdonság. A teljes mintaszetben összesen hat törzs termelt nagyobb mennyiségű OPA-t (> 50 µg/ml), ezek a *B. oryzae*, *B. sacchari*, *B. maydis* és *B. microlaenae* fajok közé sorolhatók. Ezen izolátumok az 1-es típusú szekréciós kinetikát mutató törzsekhez tartoznak a *B. sacchari* SZMC 13007 számú törzs kivételével, mely a vizsgálatok alapján a 3-as típusba sorolható. A legkiemelkedőbb termelőnek a *B. oryzae* SZMC 24163 számú törzse bizonyult.

**8. táblázat. A vizsgált *Bipolaris, Curvularia* és *Drechslera* törzsek OPA termelése.**

| ***Vizsgált törzsek*** | ***Maximális OPA koncentráció [µg/ml]*** | ***Legmagasabb OPA szint megjelenési ideje [nap]*** | ***Termelési kinetika*** |
|---|---|---|---|
| *B. aberrans* SZMC 13018 | 0,00 | - | 4. típus |
| *B. bicolor* BRIP 11420a | 0,79 | 7 | 1. típus |
| *B. bicolor* SZMC 13036 | 0,00 | - | 4. típus |
| *B. eleusines* SZMC 13017 | 0,13 | 3 | 3. típus |
| *B. maydis* SZMC 13033 | 104,08 | 12 | 1. típus |
| *B. maydis* SZMC 13035 | 5,76 | 7 | 1. típus |
| *B. maydis* SZMC 24160 | 0,19 | 5 | 2. típus |
| *B. melinidis* SZMC 13050 | 70,62 | 6 | 1. típus |
| *B. microlaenae* SZMC 13048 | 74,82 | 7 | 1. típus |
| *B. microlaenae* SZMC 13015 | 1,13 | 5 | 1. típus |
| *B. oryzae* SZMC 24161 | 98,54 | 5 | 1. típus |
| *B. oryzae* SZMC 13043 | 12,50 | 6 | 1. típus |
| *B. oryzae* SZMC 13001 | 0,00 | - | 4. típus |
| *B. oryzae* SZMC 24162 | 4,75 | 8 | 1. típus |
| *B. oryzae* SZMC 24163 | 165,26 | 6 | 1. típus |
| *B. sacchari* SZMC 13007 | 103,47 | 10 | 3. típus |
| *B. sorokiniana* SZMC 13052 | 0,29 | 8 | 3. típus |
| *B. sorokiniana* SZMC 13053 | 0,34 | 4 | 2. típus |
| *B. sorokiniana* SZMC 13054 | 0,32 | 5 | 2. típus |
| *B. sorokiniana* SZMC 13013 | 0,00 | - | 4. típus |
| *B. zeicola* SZMC 24164 | 0,86 | 5 | 1. típus |
| *B. zeicola* SZMC 24165 | 0,00 | - | 4. típus |
| *C. australiensis* SZMC 13041B | 0,80 | 7 | 1. típus |
| *C. australiensis* SZMC 13086 | 0,43 | 6 | 1. típus |
| *C. hawaiiensis* SZMC 13046B | 1,77 | 7 | 2. típus |
| *C. hawaiiensis* SZMC 13085 | 0,00 | - | 4. típus |
| *C. homomorphus* SZMC 24166 | 0,00 | - | 4. típus |
| *C. spicifer* SZMC 13038B | 1,26 | 8 | 2. típus |
| *C. spicifera* SZMC 13088 | 0,00 | - | 4. típus |
| *D. nodulosa* SZMC 13008 | 0,00 | - | 4. típus |

## 6.3 Ophiobolinok félpreparatív tisztítása az O1 sarzsból

### *6.3.1 Normál fázisú tisztítás*

A potenciális ophiobolin származékok félpreparatív tisztításának első lépéseként normál fázisú félpreparatív HPLC elválasztást alkalmaztunk. Az elválasztás során az egyes frakciók gyűjtését 8 perces időablakokban végeztük el. Az így kapott frakciók összetételének elemzését analitikai HPLC módszerrel valósítottuk meg, és a kiértékelés során az OPA mellett további négy jelentős csúcsot sikerült elkülöníteni a kromatogramokon, melyeket retenciós idejüknek megfelelően P1, P2, P3 és P4 névvel láttunk el (**9. táblázat**). Az egyes csúcsok jelnagysága alapján az F02, F04, F07, valamint az F11 frakciókat választottuk ki további félpreparatív tisztításokra. A többi komponens kis jelnagysága alapján feltételezett kis anyagmennyiség-tartalom miatt nem került további tisztításra.

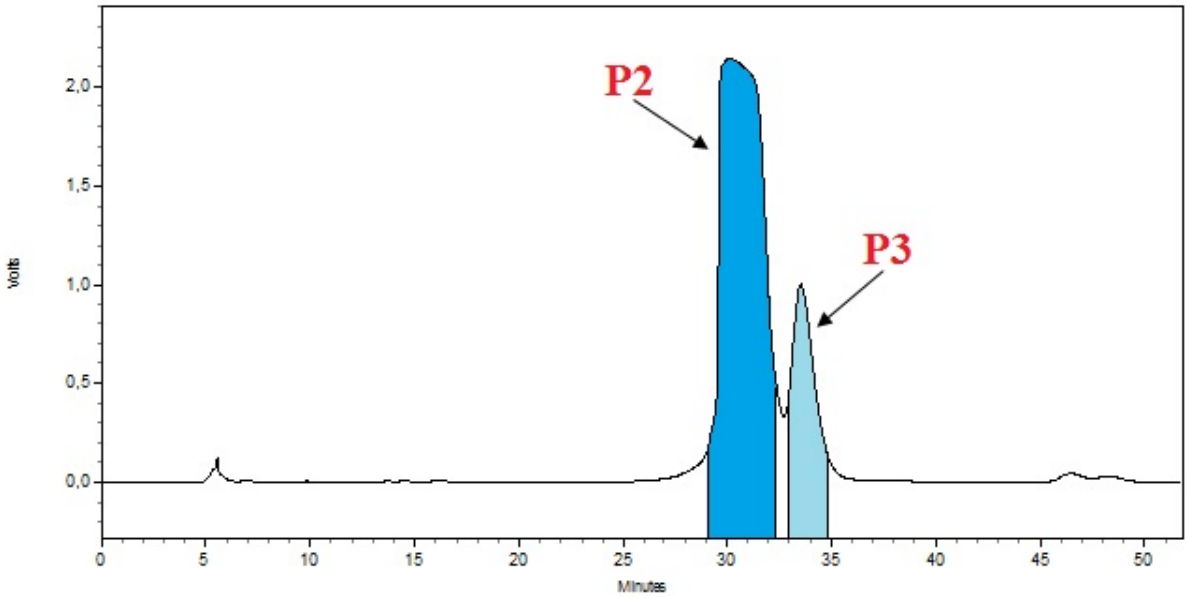
**9. táblázat. Az O1 sarzs normál fázisú elválasztása során nyert frakciók tisztaságai (%).**

| | **P1** | **OPA** | **P2** | **P3** | **P4** |
|---|---|---|---|---|---|
| F01 | 15,33 | 74,12 | 0 | 0,32 | 8,67 |
| F02 | 0,5 | 1,64 | 11,69 | 34,9 | 47,51 |
| F03 | 1,15 | 2,3 | 0 | 78,69 | 2,37 |
| F04 | 13,14 | 47,63 | 0 | 1,89 | 17,68 |
| F05 | 0,69 | 2,32 | 0 | 0 | 0,3 |
| F06 | 1,9 | 7,76 | 0 | 0 | 1,65 |
| F07 | 18,48 | 55,11 | 0 | 15,42 | 4,41 |
| F08 | 7,58 | 14,7 | 3,94 | 0 | 0,15 |
| F09 | 34,78 | 13,62 | 0 | 43,97 | 0,71 |
| F10 | 0 | 2,48 | 0 | 0 | 0,21 |
| F11 | 12,6 | 26,26 | 0 | 15,74 | 39,6 |
| F12 | 0 | 0,64 | 2,03 | 0 | 0 |

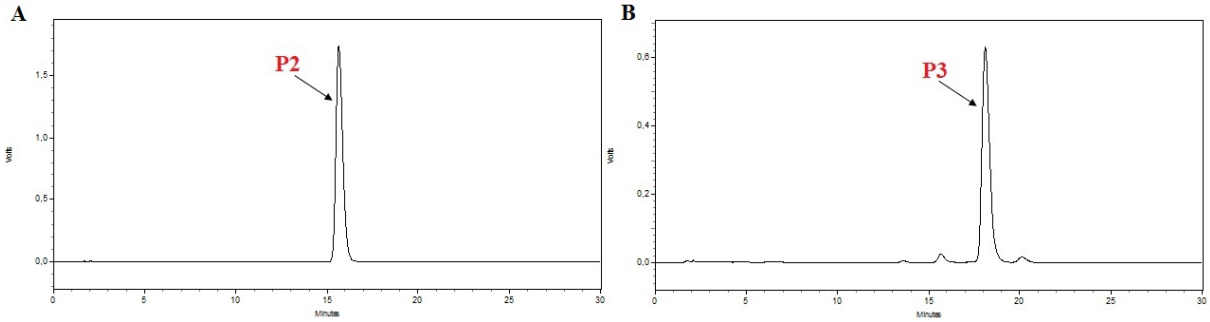
### *6.3.2 Fordított fázisú tisztítás*

A potenciális ophiobolin származékok tisztításának további lépéseit fordított fázisú félpreparatív HPLC rendszeren valósítottuk meg.

Az F02 jelű frakció tovább tisztítását szintén fordított fázisú félpreparatív rendszeren valósítottuk meg, Serva ODS kolonna alkalmazásával. Ennek során célunk volt a mintában található 11%-os tisztaságú P2 potenciális ophiobolin analóg tisztítása. A detektorjel alapján megvalósított frakcionálás során a mintakomponensünket mintegy 65%-os tisztaságban sikerült kinyernünk. A vegyület további tisztítását az eddig alkalmazott fordított fázisú félpreparatív módszerrel valósítottuk meg azzal a különbséggel, hogy állófázisként BioBasic C18 félpreparatív HPLC kolonnát alkalmaztunk (**7. ábra**). Az elválasztás során mind a P2, mind a P3 jelű mintakomponens tisztítását elvégeztük, majd a kapott frakciók tisztaságát analitikai HPLC vizsgálat segítségével ellenőriztük. A P2 esetén a vegyület tisztasága 98%-nak bizonyult, míg P3 esetében ez az érték 91% volt (**8. ábra**).



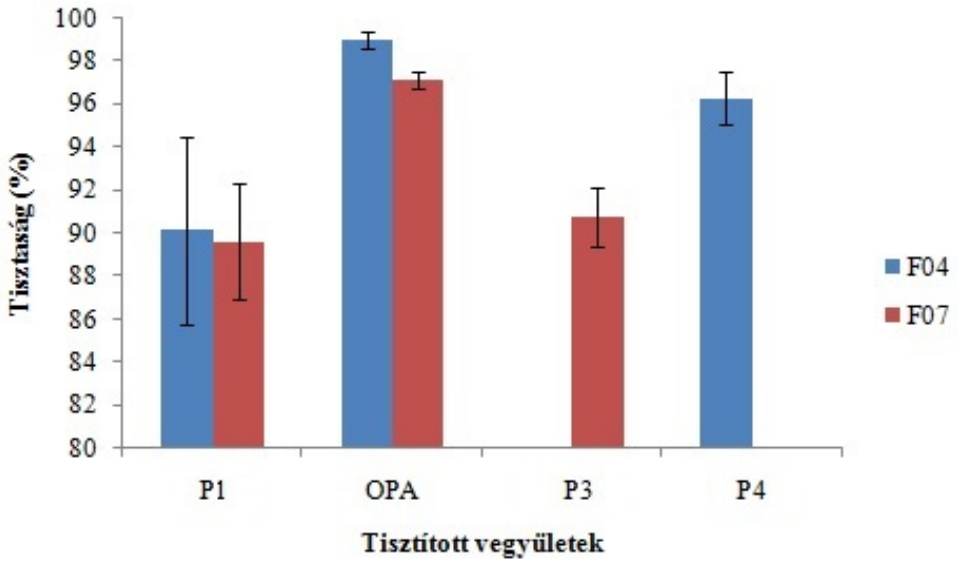

**7. ábra. P2 félpreparatív tisztítása fordított fázisú BioBasic-18 oszlopon.**



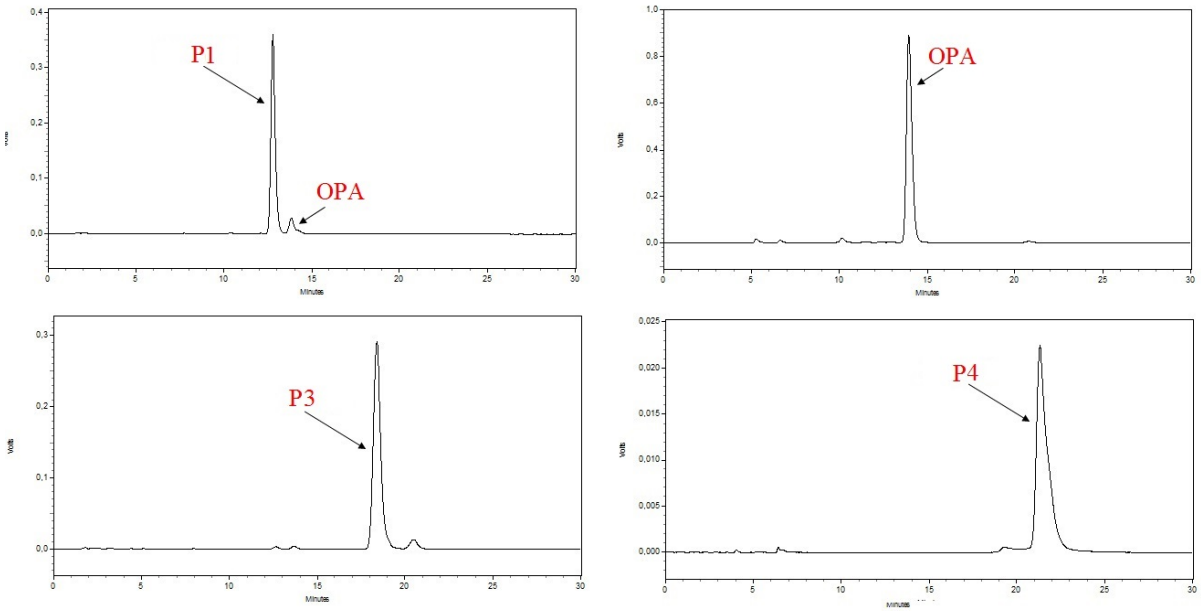

**8. ábra. A: A tisztított P2 jelű potenciális ophiobolin származék kromatogramja. B: A tisztított P3 jelű vegyület kromatogramja.**

Az F04 és F07 jelű frakciók tisztítása során injektálásonként 3-3 frakció szedését végeztük el detektorjel alapján, különös figyelmet fordítva arra, hogy az elválasztott

vegyületek kromatográfiás csúcsainak elejét és végét ne gyűjtsük, így biztosítva, hogy az egyes anyagok a lehető legnagyobb tisztaságban kerüljenek frakcionálásra. A kapott frakciók tisztaságát analitikai elválasztásokkal ellenőriztük. Az azonos retenciós idővel eluálódó csúcsokat tartalmazó frakciókat egyesítettük, majd bepárlás után a további vizsgálatokig -20 °C-on tároltuk. A fordított fázisú tisztítások során mind az OPA, a P3 és a P4 jelű vegyület esetében 90%-os tisztaság feletti értéket sikerült elérnünk, míg a P1 potenciális ophiobolin származék tisztasága 90%-nak adódott (**9. ábra**), ahol a szennyezés jelentős részét az OPA adta (**10. ábra**).

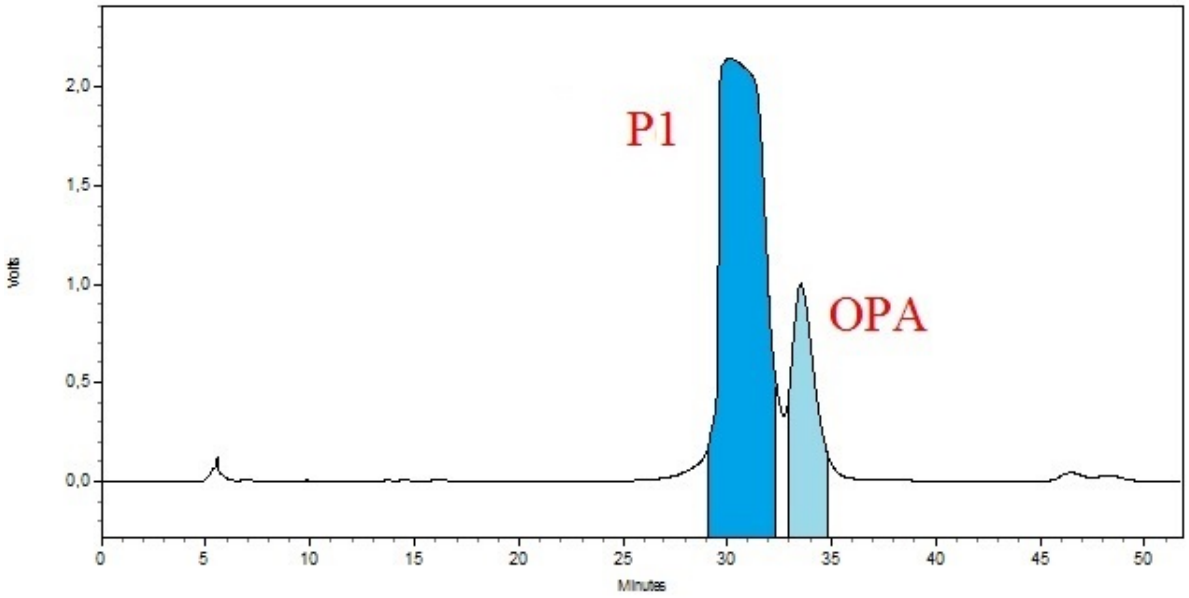



**9. ábra. F04 és F07 frakcionálásával nyert vegyületek tisztaságai.**

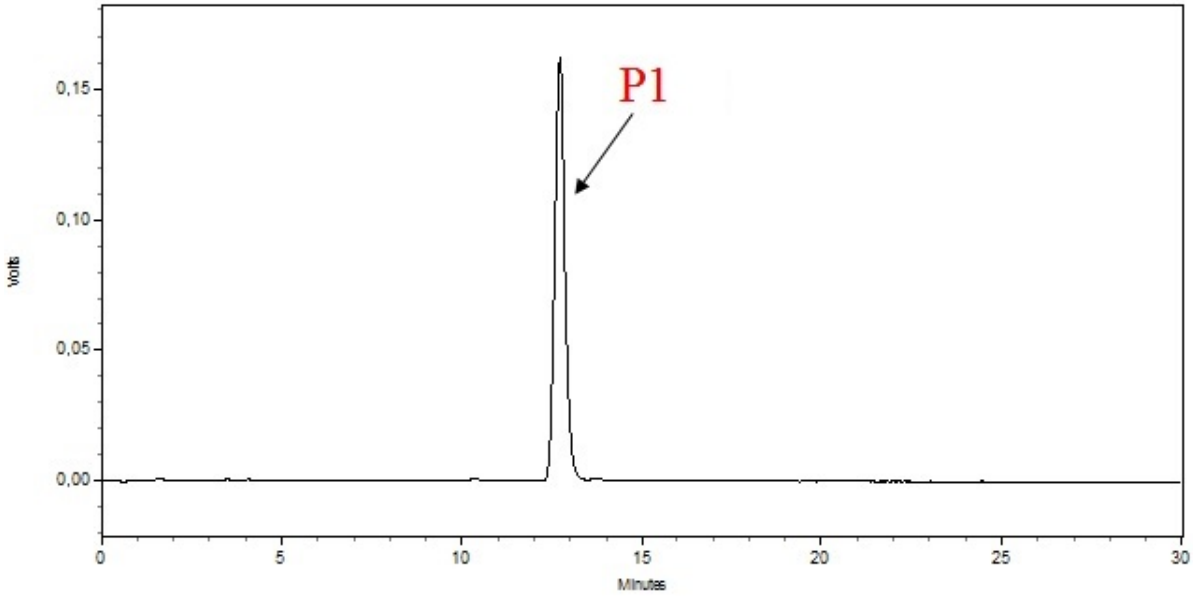



**10. ábra. Az F04 és F07 frakcionálásával nyert vegyületek kromatogramjai.**

Az egyes frakciók tisztaságának ellenőrzése során a P1 jelű komponens további tisztítását tartottuk szükségesnek. Ennek megvalósítására továbbra is az **5.6.1.2 fejezet**ben tárgyalt félpreparatív HPLC módszert alkalmaztuk (**11. ábra**). A kapott frakciókat egyesítettük, majd ennek tisztaságát analitikai HPLC méréssel ellenőriztük és 97%-nak adódott (**12. ábra**).



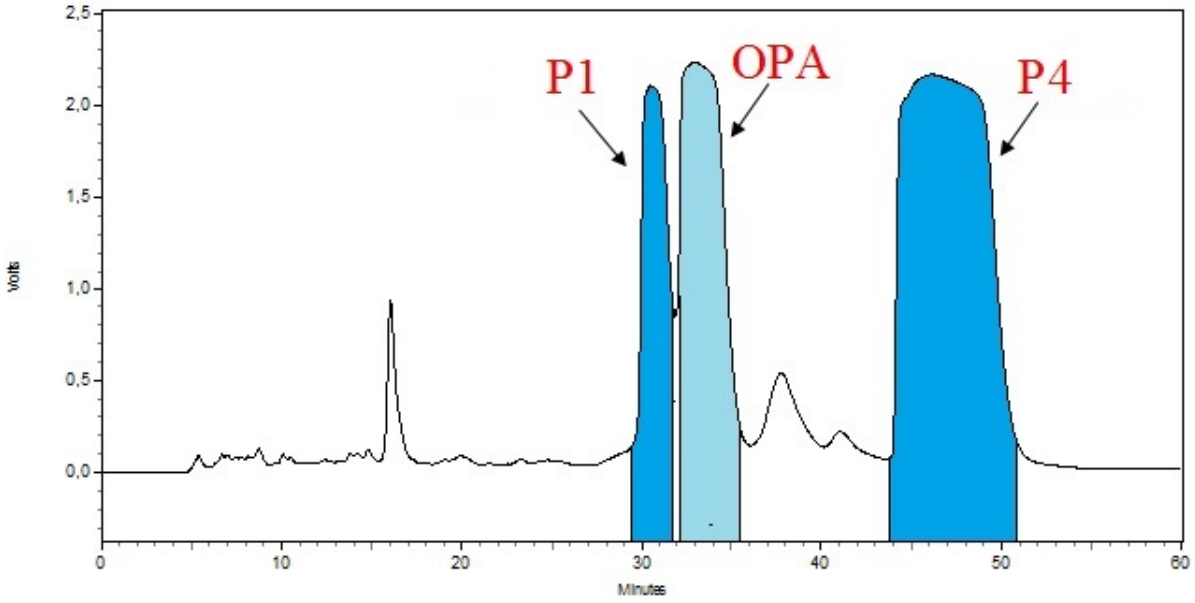

**11. ábra. A P1 vegyület tovább tisztításának félpreparatív kromatogramja.**



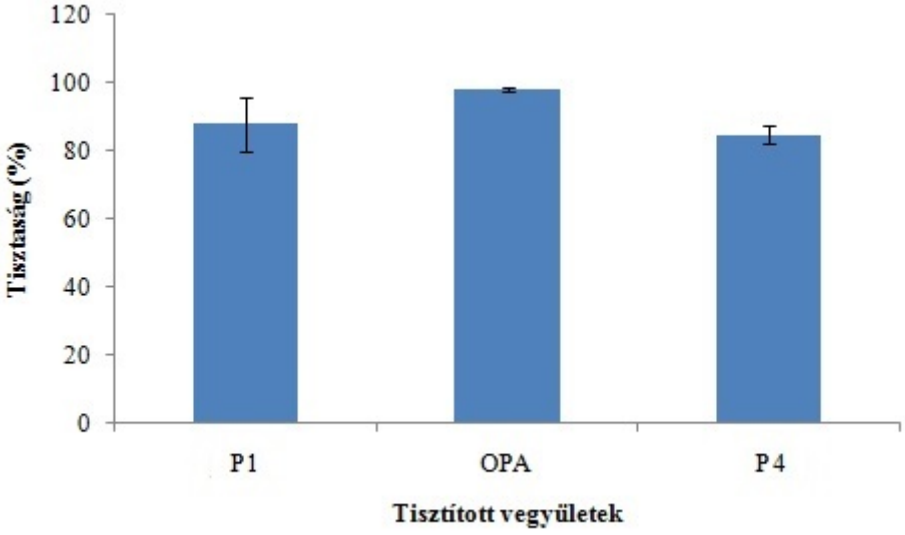

**12. ábra. A P1 jelű vegyület analitikai kromatogramja a harmadik tisztítási lépés után.**

Az F11 jelű frakció tovább tisztítását a fenti módszerrel szintén elvégeztük. A művelet során három potenciális ophiobolin származék, a P1, az OPA és a P4 tisztítását igyekeztünk

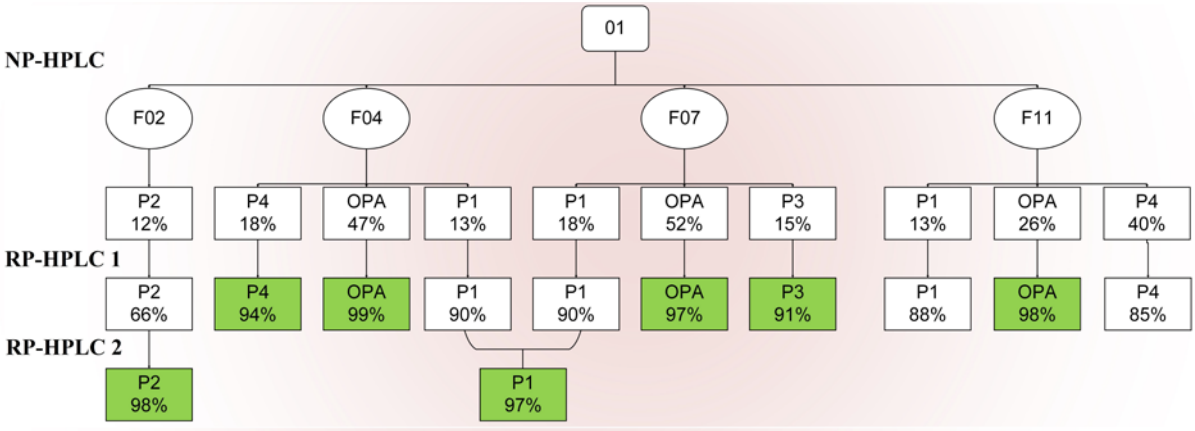
megvalósítani (**13. ábra**). Az egyes frakciók tisztaságát a **14. ábra** mutatja. Az azonos komponenseket tartalmazó frakciókat egyesítettük és további felhasználásig -20 °C-on tároltuk. A fordított fázisú félpreparatív tisztítások ezen szakaszában az OPA-t nagy tisztaságban sikerült kinyernünk.




**13. ábra. F11 frakció félpreparatív kromatogramja.**




**14. ábra. Az F11 frakcionálása során kapott vegyületek tisztasága.**



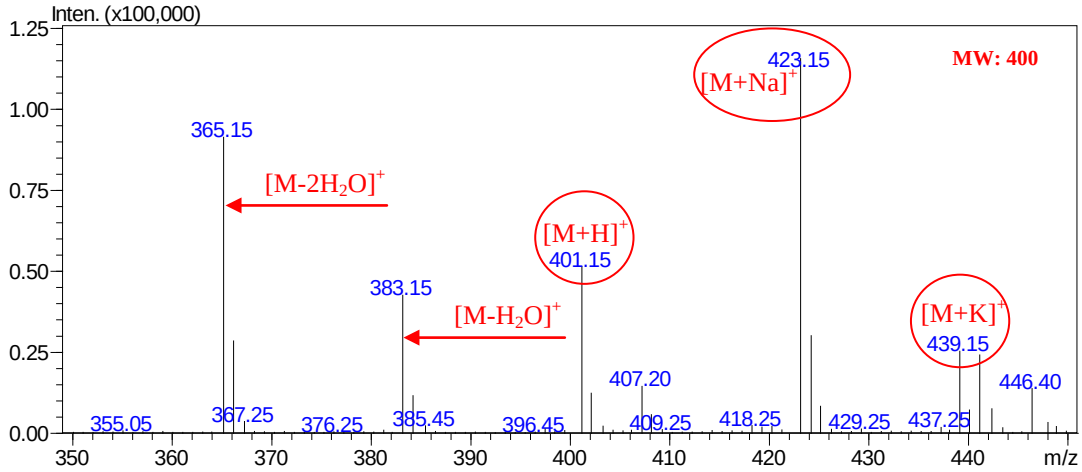

**15. ábra. Az O1 sarzs preparatív tisztításának folyamatábrája. Az egyes vegyületek tisztasága %-os értékben látható.**

Áttekintve az eddigi preparatív célú elválasztásokat, az O1 sarzsból sikeresen tisztítottunk 4 potenciális ophiobolin analógot, valamint az OPA-t (**15. ábra**). A tisztításokat három lépésben, egy NP-HPLC, illetve két, egymást követő RP-HPLC elválasztással valósítottuk meg. Az OPA, a P4 és a P3 jelű vegyületeket már az első fordított fázisú tisztítási lépést követően 90% feletti tisztasággal sikerült kinyernünk, míg az F02 frakcióból származó P2, valamint az F04 és F07 frakciókból nyert P1 vegyületek tisztítására egy második RP-HPLC lépést alkalmaztunk. Ennek eredményeként a P2-t 98%-os, míg a P1-et 97%-os tisztaságban nyertük ki.

## 6.4 A tisztított minták további vizsgálatai

### *6.4.1 Tömegspektrometriás vizsgálatok*

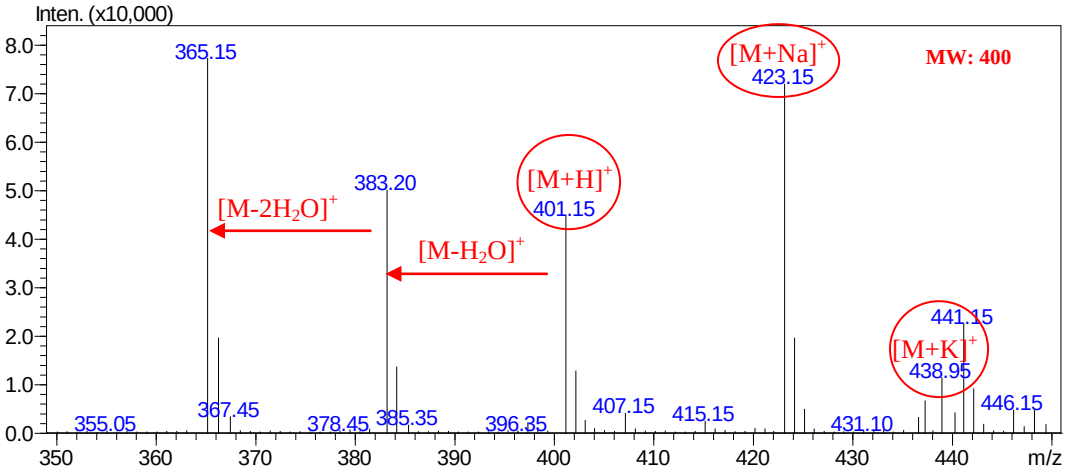
A munkánk során tisztított vegyületek tömegspektrometriás vizsgálatát LCMS-2010A egyszeres kvadrupól tömegspektrométer segítségével valósítottuk meg. Első lépésként az OPA standard tömegspektrumát vettük fel pozitív ionizációval, pásztázási módban (*m/z* 350-450), mely teljesen megegyezett az általunk OPA-ként azonosított vegyület, hasonló körülmények között felvett tömegspektrumával (**16. ábra**).




**16. ábra. Tisztított OPA pozitív ionizációs módban felvett ESI-SCAN tömegspektruma.**

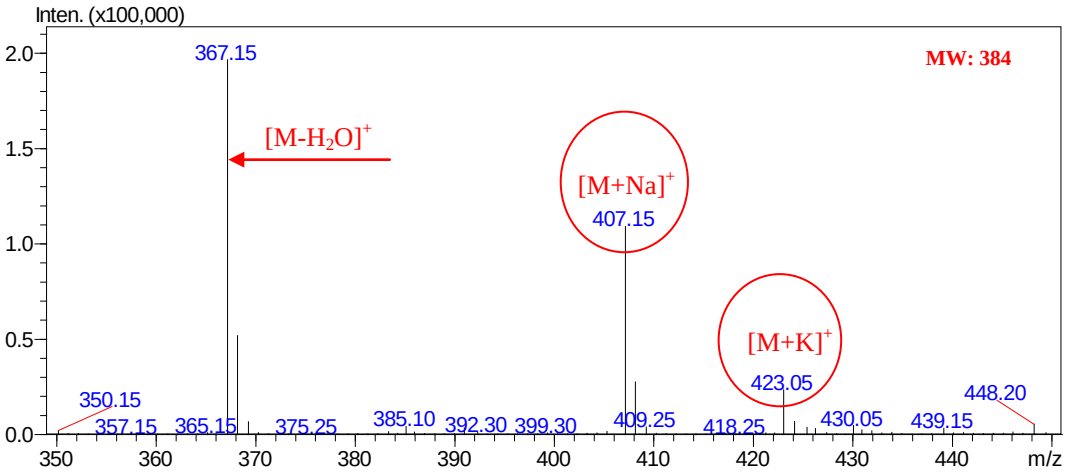
A molekula hidrogén adduktja $[M+H]^+$ jól látszik a pozitív ESI ionizáció esetén *m/z* 401 értéknél. Kiemelkedő intenzitással figyelhető meg a nátriummal addícionált ion tömege az *m/z* 423 értéknél $[M+Na]^+$, valamint a kálium addukt $[M+K]^+$ (*m/z* 439) is. Megfigyelhetők továbbá az ophiobolinokra jellemző vízvesztéssel keletkező ionok is (Sugawara és mtsi. 1988, Evidente és mtsi. 2006) jelentős intenzitással *m/z* 383 ($[M+H-H_2O]^+$) és *m/z* 365 ($[M+H-2H_2O]^+$) értékeknél. Ezen adatok alapján kijelenhetjük, hogy az általunk tisztított és OPA-ként azonosított vegyület várható molekulatömege 400 g/mol, amely megfeleltethető az OPA irodalmi adatokban található moláris tömegének.

A P1 jelű tisztított vegyület tömegspektrometriás vizsgálata (**17. ábra**) során az OPA-hoz hasonlóan jól látható a pozitív ESI ionizációnál képződő hidrogén addukt ($[M+H]^+$, *m/z* 401), valamint az oldószerben szennyezőként jelen levő nátriummal addícionált ion tömege az *m/z* 423 értéknél $[M+Na]^+$, valamint a kálium addukt tömege *m/z* 439 értéknél. Nagy intenzitással jelentkeznek a vízvesztéssel keletkező ionok is ($[M+H-H_2O]^+$ (*m/z* 383), $[M+H-2H_2O]^+$ (*m/z* 365)). Ezen adatok alapján a P1 jelű potenciális ophiobolin származék várható molekulatömege 400 g/mol.




**17. ábra. Tisztított P1 pozitív ionizációs módban felvett ESI-SCAN tömegspektruma.**

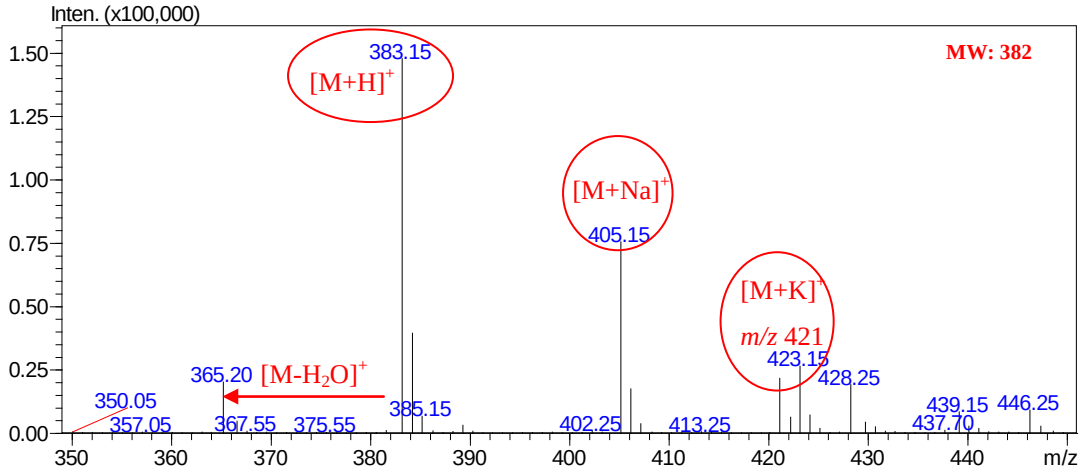
A P2 vegyület pozitív ESI ionizációnál felvett tömegspektrumán kiemelkedő jelnagysággal figyelhető meg a molekula nátrium adduktjának $[M+Na]^+$ megfeleltethető *m/z* 407 érték, valamint kis intenzitással ugyan látható a molekula kálium adduktja is $[M+K]^+$ *m/z* 423 értéknél. A korábbiaknak megfelelően a vízvesztéssel keletkező $[M+H-H_2O]^+$ ion is megfigyelhető *m/z* 367 értéknél. Érdekes módon a korábbiakkal ellentétben az $[M+H]^+$ nem jelentkezik a tömegspektrumon. Ezen adatok figyelembe vételével a tisztított vegyület várható molekulatömege 384 g/mol (**18. ábra**).




**18. ábra. Tisztított P2 pozitív ionizációs módban felvett ESI-SCAN tömegspektruma.**

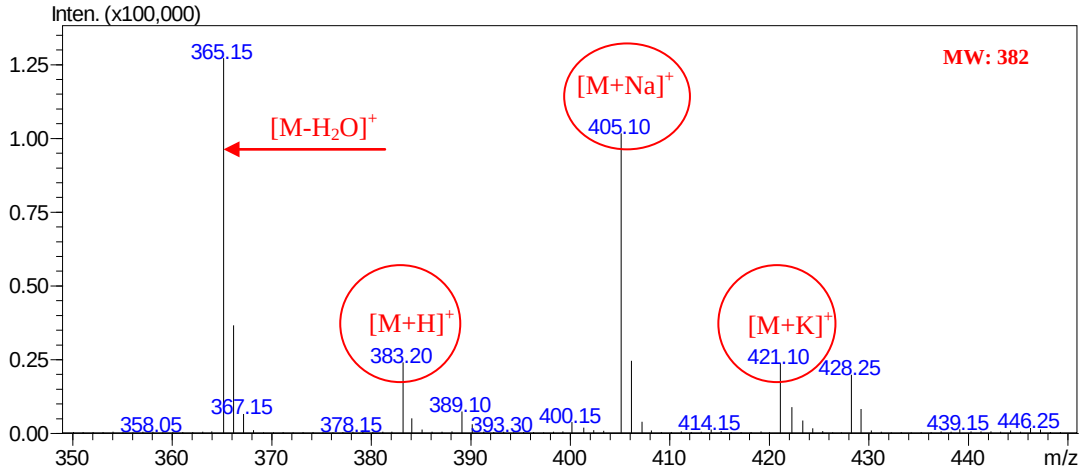
Mivel az OPA esetében pozitív ESI teljes pásztázási üzemmódban kaptuk a legnagyobb intenzitást $[M+Na]^+$ esetében, ezért a P3 feltételezett ophiobolin származék esetében is pozitív ionizációt alkalmaztunk. A **19. ábra** jól látható a molekula pozitív ESI ionizációnál képződő nátrium adduktja $[M+Na]^+$ *m/z* 405 értéknél. Továbbá megfigyelhető a molekula kálium adduktjának megfelelő *m/z* 423 érték is. Az OPA-nál tapasztaltakkal

megegyezően a vizsgált vegyület hidrogén adduktja $[M+H]^+$ nagy intenzitással jelenik meg a tömegspektrumon *m/z* 383 értéknél. Kis intenzitással ugyan, de látható az OPA-ra is jellemző, vízvesztéssel keletkező ion $[M-H_2O]^+$ (*m/z* 365) is. Mindezek alapján a P3 jelű komponens molekulatömege 382 g/mol, ami az ophiobolinok családjában gyakran fellehető molekulatömeg.




**19. ábra. Tisztított P3 pozitív ionizációs módban felvett ESI-SCAN tömegspektruma.**

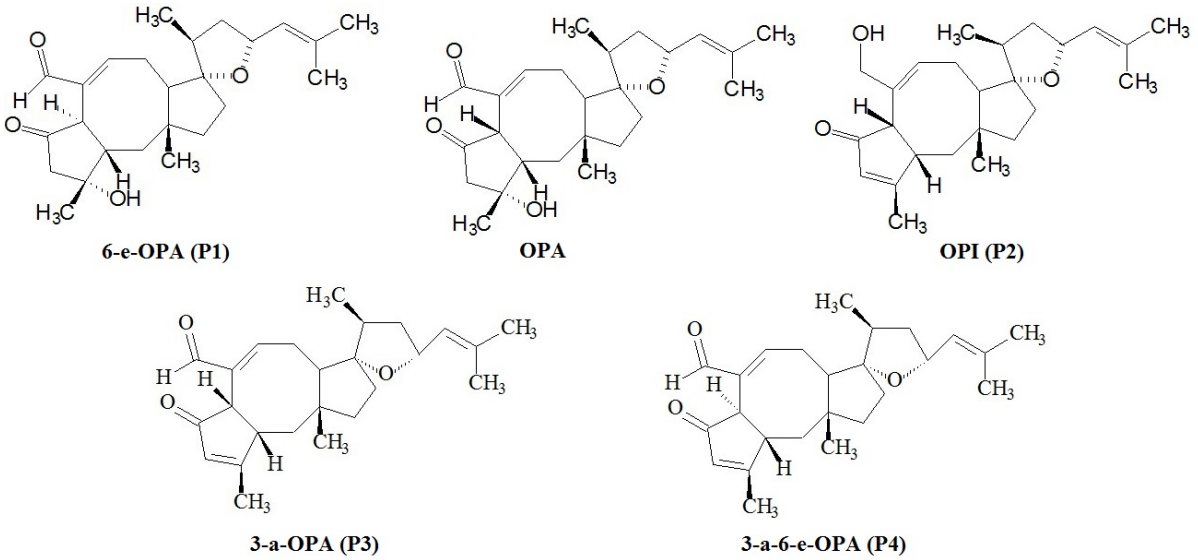
A P4 jelű vegyület esetében nagy intenzitással figyelhető meg a nátrium addukt $[M+Na]^+$ *m/z* 405 értéknél, illetve kisebb intenzitással a *m/z* 421 érték, mely a molekula kálium adduktjának felel meg $[M+K]^+$. Szintén alacsony intenzitással látható a molekula hidrogén adduktja ($[M+H]^+$ *m/z* 383), míg a vízvesztéssel keletkező $[M+H-H_2O]^+$ ion a nátrium addukthoz hasonlóan kiemelkedő intenzitással jelentkezik az *m/z* 365 értéknél. Ezek alapján molekulatömege 382 g/mol (**20. ábra**).




**20. ábra. Tisztított P4 pozitív ionizációs módban felvett ESI-SCAN tömegspektruma.**

### *6.4.2 NMR vizsgálatok*

A tisztított vegyületek tömegei alapján feltételeztük, hogy azok az ophiobolin származékok közé tartoznak, azonban kilétük pontos megállapításához azonban szükséges volt szerkezeti felépítésük, konformációjuk ismerete. $^{1}$H NMR, $^{1}$H-$^{1}$H COSY és HMBC vizsgálatok alapján (**21. 22. 23. 24. 25. Mellékletek**) megerősítették azon feltevésünket, miszerint az általunk tisztított és HPLC, valamint HPLC-MS mérések alapján OPA-nak vélt anyag valóban az. Az NMR vizsgálatok során a felvett spektrumok alapján megállapítottuk, hogy az általunk tisztított további négy potenciális ophiobolin analóg a korábbi feltételezéseknek megfelelően valóban az ophiobolinok családjába tartozó vegyület. A tömegspektrometriás, valamint NMR vizsgálatok eredményeként kijelenthetjük, hogy az általunk tisztított P1 jelű komponens 6-e-OPA, a P2 jelű komponens ophiobolin I, a P3 jelű komponens 3-a-OPA, míg a P4 jelű komponens a 3-a-6-e-OPA (**21. ábra**).




**21. ábra. Az O1 sarzsból tisztított ophiobolin származékok szerkezeti képletei.**

Összehasonlítva az O1 sarzs tisztítása során nyert ophiobolin származékokat a szakirodalomban fellelhető, szintén *B. oryzae*-ből tisztított ophiobolinokkal, megállapítható, hogy mind az OPA (Orsenigo 1957), mind a 6-e-OPA (Kim és mtsi. 1984), az OPI (Sugawara és mtsi. 1987), a 3-a-OPA (Kim és mtsi. 1984), valamint a 3-a-6-e-OPA (Kim és mtsi. 1984) már leírásra kerültek ezen fonalas gombából.

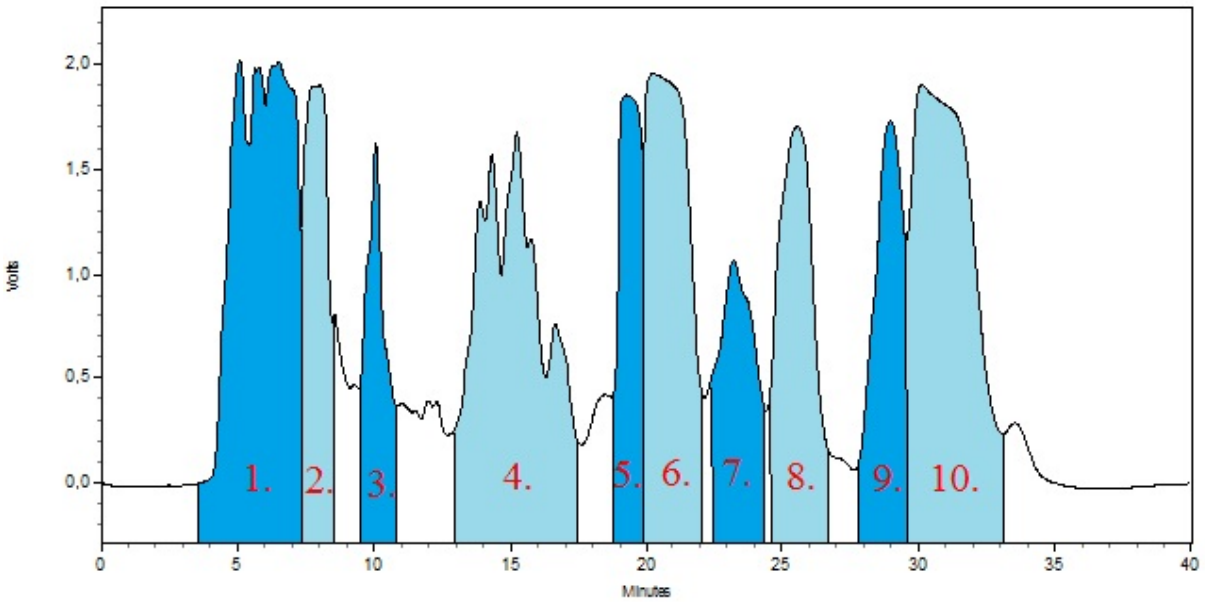
## 6.5 Ophiobolinok félpreparatív tisztítása az O2, O3 és O4 sarzsból

További potenciális ophiobolin származékok tisztításához szintén a *B. oryzae* SZMC 24163 jelű törzsét használtuk. A nyers extraktumok tömegét analitikai mérleg segítségével meghatároztuk (**10. táblázat**).

**10. táblázat. A további tisztításokba bevont sarzsok térfogata és szárazanyag-tömege.**

| *Sarzs* | *Leszűrt mennyiség (ml)* | *Bepárolt mennyiség (g)* |
|---|---|---|
| **O2** | 1280 | 0,710 |
| **O3** | 1260 | 0,410 |
| **O4** | 3510 | 0,530 |

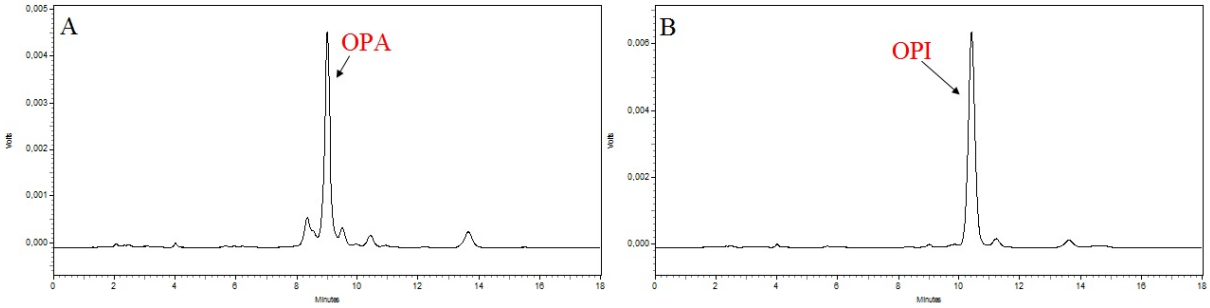
Az O2 sarzs komponenseinek tisztításához az RP-1 módszert alkalmaztuk 50 µl injektálási térfogat mellett (**22. ábra**).




**22. ábra. O2 sarzs félpreparatív kromatogramja (RP-1 módszer).**

A tisztítási folyamat során 10 frakció gyűjtésére került sor, melyekről rotációs vákuumbepárló segítségével eltávolítottuk a szerves oldószert. A 6. és 8. frakciók bepárlása során a tisztított vegyületek kristályosodásnak indultak, melynek eredményeként a 6. frakcióból 35 mg anyagot nyertünk. Analitikai HPLC-n ellenőriztük ezen anyag tisztaságát

(65%), valamint ismert referenciavegyületek segítségével megállapítottuk, hogy a kérdéses vegyület az OPA (**23. ábra - A**). A 8. frakció esetében a kikristályosodott vegyület tömege nem volt megállapítható, azonban az analitikai mérések alapján ez a vegyület az OPI volt, tisztasága 83%-nak bizonyult (**23. ábra - B**).




**23. ábra. Az O2 sarzs 6-os frakciójából kristályosodott OPA (A), valamint 8-as frakciójából kristályosodott OPI kromatogramjai (B).**

A vízig párolt frakciókat etil-acetáttal extraháltuk, majd ezt követően elkülönítettük a felső fázist, elpárologtattuk az oldószert és megmértük a tömegüket.

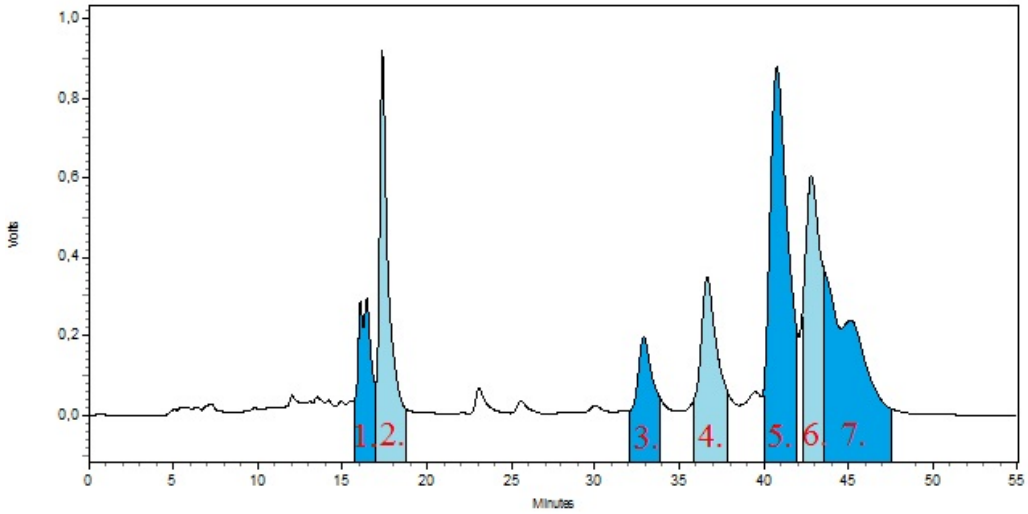
Az O2 sarzs frakcióinak az ellenőrzés során azonosított fő alkotóit és tisztaságát a **11. táblázat** szemlélteti. A tisztaságot a csúcsok alatti terület százalékos megoszlása adja.

**11. táblázat. Az O2 sarzs fordított fázisú tisztítása során nyert frakciók összetétele és tisztasága.**

| *O2 sarzs frakciói* | *Termék tömege (mg)* | *Összetétel* | *Tisztaság [%]* |
|---|---|---|---|
| **O2-F1** | 100 | ISM-01 | 12,3 |
| | | ISM-02 | 19,1 |
| | | ISM-03 | 51,1 |
| **O2-F2** | - | ISM-04 | 21,1 |
| | | ISM-05 | 66,4 |
| **O2-F3** | 45 | ISM-06 | 62,6 |
| **O2-F4** | 135 | ISM-08 | 14,1 |
| | | ISM-09 | 25,0 |
| | | ISM-10 | 30,1 |
| | | ISM-11 | 14,8 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **O2-F5** | 10 | 6-e-OPA | 84,2 |
| **O2-F6** | 25 | OPA | 64,7 |
| **O2-F7** | 95 | ISM-14 | 20,9 |
| | | ISM-15 | 38,7 |
| **O2-F8** | 10 | OPI | 82,7 |
| **O2-F9** | 35 | ISM-16 | 14,6 |
| | | 3-a-OPA | 73,8 |
| **O2-F10** | 50 | 3-a-6-e-OPA | 88,3 |

Az O2 sarzs 7. frakciója két ismeretlen anyagot tartalmazott ISM-14-et és ISM-15-öt rendre 20,9% és 38,7% tisztaságban. Mivel a kapott kromatogramon mindkét vegyület kiemelkedően nagy jelet adott, így a továbbiakban ezek tisztítására fókuszáltunk. Ezt a tisztítási lépést az RP-2 módszerrel valósítottuk meg, melynek során további 7 alfrakció került gyűjtésre (**24. ábra**).




**24. ábra. Az O2-F7 tisztítása Serva D6900 oszlopon (RP-2 módszer).**

A frakciószedést követően a kapott frakciókat bepároltuk, majd MeCN-ben visszaoldva analitikai HPLC segítségével vizsgáltuk összetételüket és tisztaságukat (**12. táblázat**).

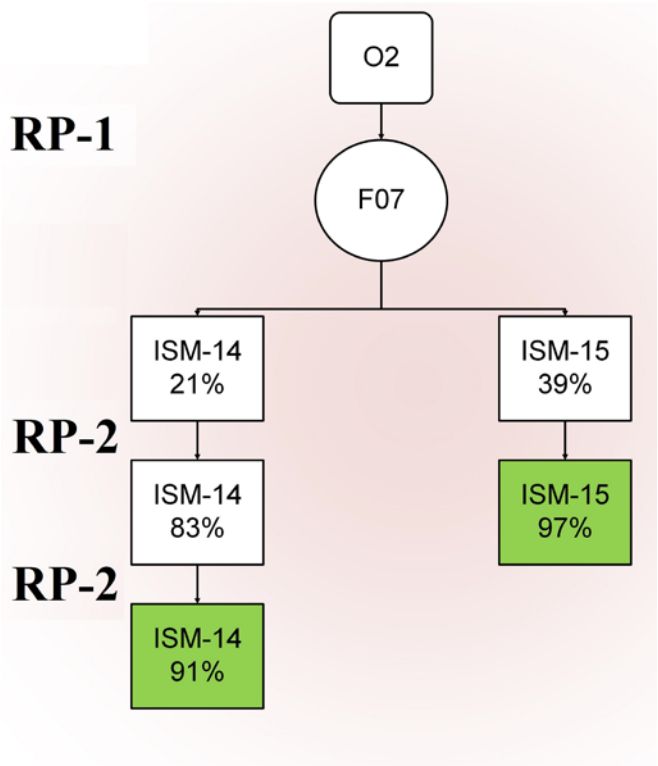
**12. táblázat. Az O2-F7 félpreparatív tisztítása során nyert alfrakciók összetétele és tisztasága.**

| *O2 sarzs B-F7 alfrakciói* | *Termék tömege (mg)* | *Frakciók összetétele* | *Tisztaság [%]* |
|---|---|---|---|
| **O2-F7-A1** | 35 | ISM-04 | 33,2 |
| | | ISM-05 | 30,8 |
| **O2-F7-A2** | 25 | ISM-05 | 81,4 |
| **O2-F7-A3** | 10 | OPA | 22,1 |
| | | ISM-14 | 31,8 |
| | | ISM-15 | 27,4 |
| **O2-F7-A4** | 15 | ISM-15 | 79,0 |
| **O2-F7-A5** | 5 | ISM-15 | 97,0 |
| **O2-F7-A6** | 5 | ISM-14 | 83,1 |
| **O2-F7-A7** | 15 | ISM-14 | 22,2 |
| | | ISM-15 | 25,2 |
| | | OPI | 21,4 |
| | | 3-a-OPA | 22,2 |

Az O2 sarzs O2-F7 jelű frakciójának 5. alfrakciója már 97,04%-os tisztaságúnak bizonyult, tehát ez a komponens további tisztítási lépéseket nem igényelt. Az oldószerből visszanyerve 5 mg ISM-15 nevű anyagot kaptunk.

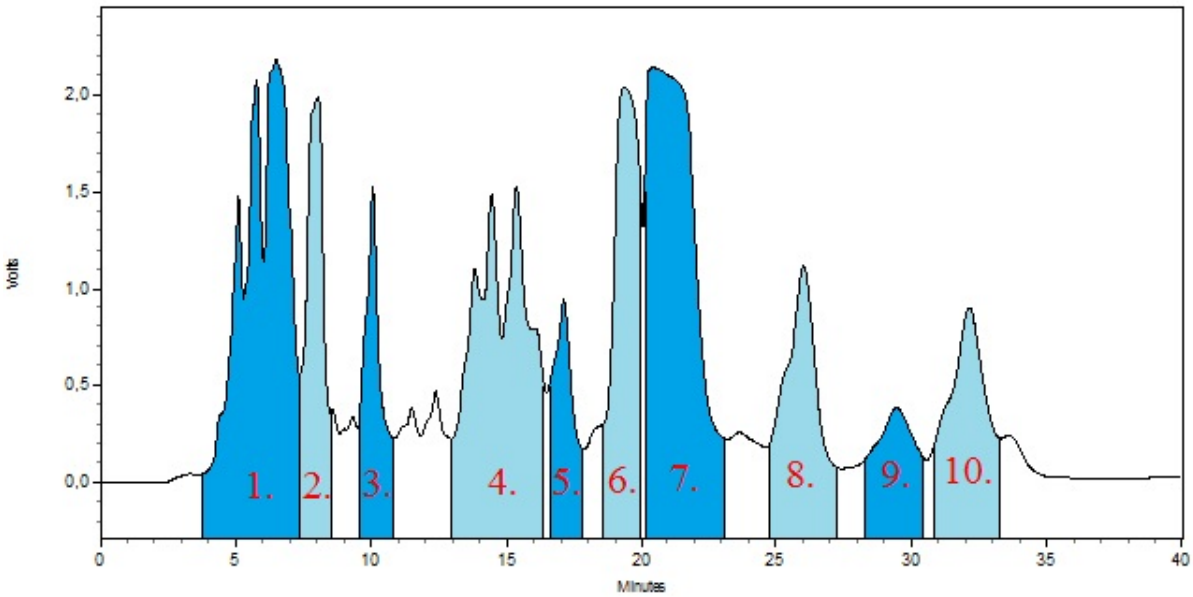
Az O2 sarzs O2-F7 jelű frakciójának 6. alfrakciójának tovább tisztítását szintén az RP-2 módszerrel valósítottuk meg, melynek eredménye 5 mg 91%-os tisztaságú ISM-14 nevű anyag kinyerése volt.

Összegezve az O2 sarzs eddig tisztítását elmondhatjuk, hogy a legígéretesebbnek tűnő F07 frakcióból két lépésben sikeresen tisztítottuk az ISM-15 jelű potenciális ophiobolin analógot, míg az ISM-14 90% feletti tisztaságának eléréséhez egy további, harmadik RP-HPLC tisztítási lépés elvégzését tartottuk szükségesnek (**25. ábra**).




**25. ábra. Az O2 sarzs F07 frakciója tisztításának folyamatábrája. Az egyes vegyületek tisztasága %-os értékben látható.**

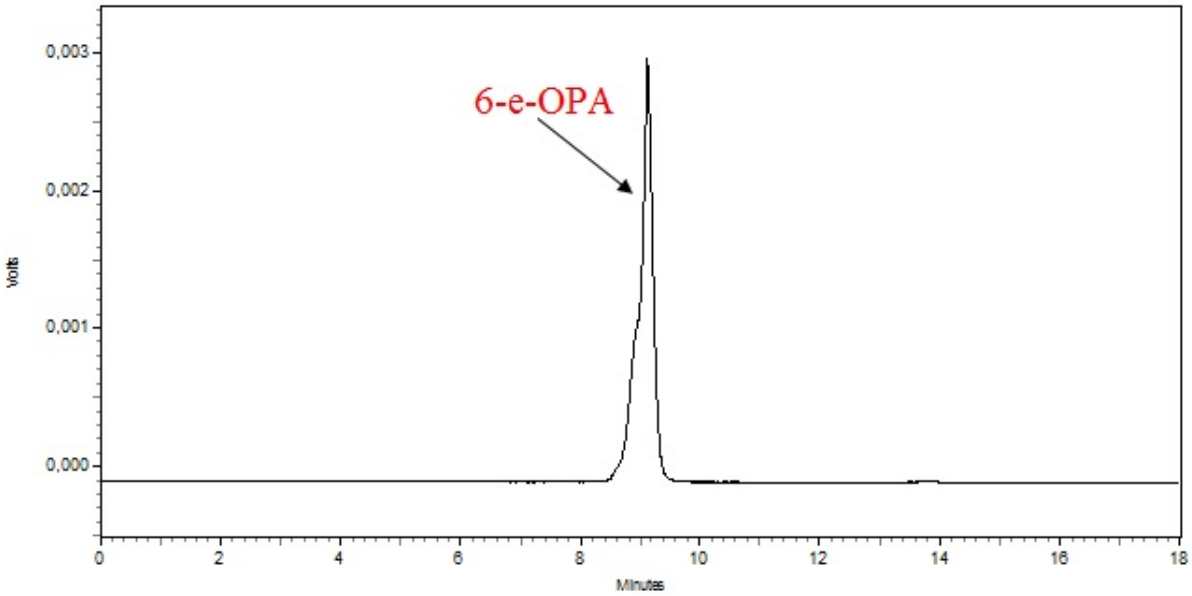
Az O3 sarzs félpreparatív RP-HPLC tisztítását szintén az RP-1 módszerrel végeztük, melynek során 10 frakció került elválasztásra (**26. ábra**).




**26. ábra. Az O3 sarzs félpreparatív kromatogramja (RP-1 módszer).**

A frakciószedést követően az egyes frakciókból rotációs vákuumbepárló segítségével eltávolítottuk a szerves oldószert. A 6. és 7. frakció esetében, hasonlóan az O2 sarzsnál tapasztaltakhoz, kristályosodás indult meg. A folyamat elősegítése céljából mindkét frakciót 4 °C-on tartottuk 12 órán át, majd leszűrtük. Az így nyert kristályos anyagokat szárítószekrényben szárítottuk, majd analitikai mérleg segítségével megmértük tömegüket, mely a 6. frakció esetén 5 mg-nak, míg 7. frakció esetén 36,1 mg-nak adódott.

A 7. frakció kristályosodása során keletkezett vizes anyalúg EtOAc-os extrahálásával további 5 mg anyagot sikerült kinyerni, ami analitikai HPLC vizsgálatok alapján OPA-nak bizonyult. A kristályosodott frakciókból nyert anyagok tisztaságát szintén analitikai HPLC eljárással ellenőriztük. Ezen mérések alapján a 6. frakcióból nyert vegyület 6-e-OPA (**27. ábra**), míg a 7. frakcióból kristályosodott anyag OPA volt.




**27. ábra. O3 sarzsból tisztított 6-e-OPA analitikai kromatogramja.**

A kikristályosodott frakciókból nyert termékek egy részét visszaoldottuk MeCN-ben és analitikai rendszerben ellenőrizve kiderült, hogy a 6. frakció a 6-e-OPA jelű anyagot, míg a 7. frakció az OPA-t tartalmazza nagy tisztaságban.

A vízig történő bepárlást etil-acetátos extrahálás követte, végül pedig a szárazra párlás. A 6. és 7. frakció esetében a szűrés során lecsepegett folyadékot is bepároltuk és extraháltuk, ugyanis abban is maradt még bizonyos mennyiségű anyag. A következő lépésben a bepárolt frakcióknak lemértük a tömegét (**13. táblázat**).

A beszárított anyagokat visszaoldottuk acetonitrilben és analitikai HPLC-n ellenőriztük a tisztaságukat. Az O3 sarzs frakcióinak fő alkotóit és tisztaságát a **13. táblázat** mutatja. A tisztaságot a csúcsok alatti terület százalékos megoszlása adja.

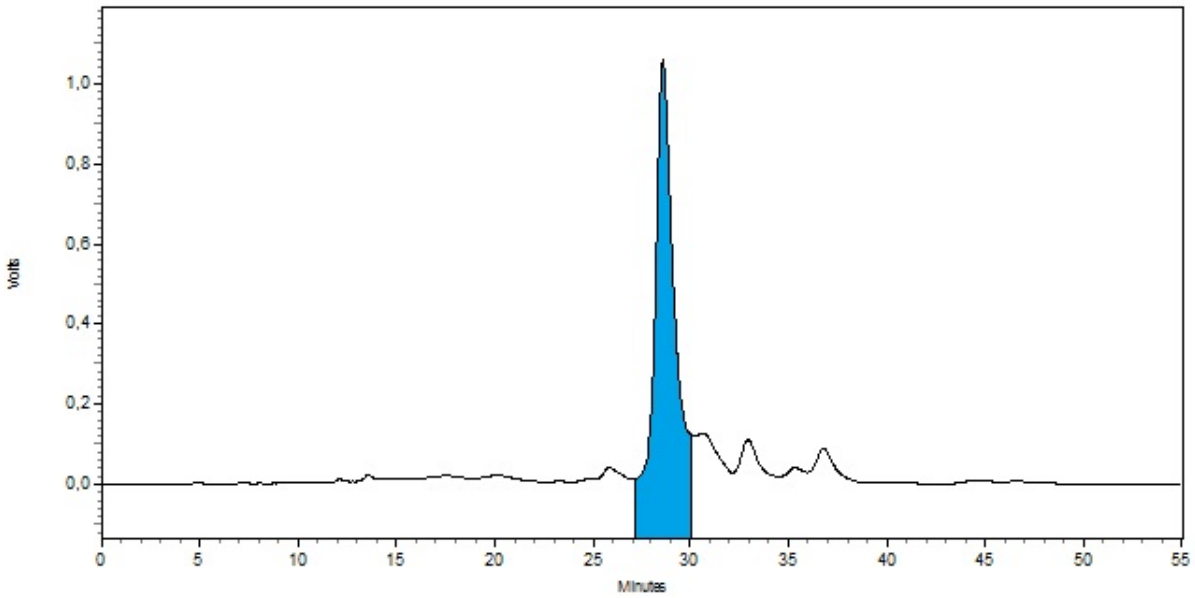
**13. táblázat. Az O3 sarzs frakcióinak összetétele és tisztasága.**

| *O3 sarzs frakciói* | *Termék tömege (mg)* | *Összetétel* | *Tisztaság* |
|---|---|---|---|
| **O3-F1** | 30 | ISM-01 | 11,0 |
| | | ISM-02 | 23,7 |
| | | ISM-03 | 58,0 |
| **O3-F2** | 5 | ISM-05 | 85,4 |
| **O3-F3** | 10 | ISM-06 | 73,8 |
| **O3-F4** | 25 | ISM-08 | 23,3 |
| | | ISM-09 | 29,6 |
| | | ISM-10 | 38,4 |
| **O3-F5** | 10 | ISM-12 | 68,8 |
| **O3-F6** | 5 | ISM-13 | 29,6 |
| | | 6-e-OPA | 51,8 |
| **O3-F7** | 10 | OPA | 61,5 |
| **O3-F8** | 20 | OPI | 94,2 |
| **O3-F9** | - | ISM-17 | 54,4 |
| | | 3-a-OPA | 26,8 |
| **O3-F10** | 5 | 3-a-6-e-OPA | 93,0 |

Az O3 sarzs félpreparatív tisztítása során már az első elválasztási lépésben nagy tisztaságban sikerült kinyerni a 8. frakcióból 20 mg, 94,2%-os tisztaságú OPI-t, míg a 10. frakcióból 5 mg, 93,03%-os 3-a-6-e-OPA-t.

Az O3-F5 frakciót alkotó ISM-12 nevű anyag 68,8%-os tisztasága, valamint a kromatogramon mutatott kiemelkedő jelnagysága alapján további tisztítási lépést tartottunk

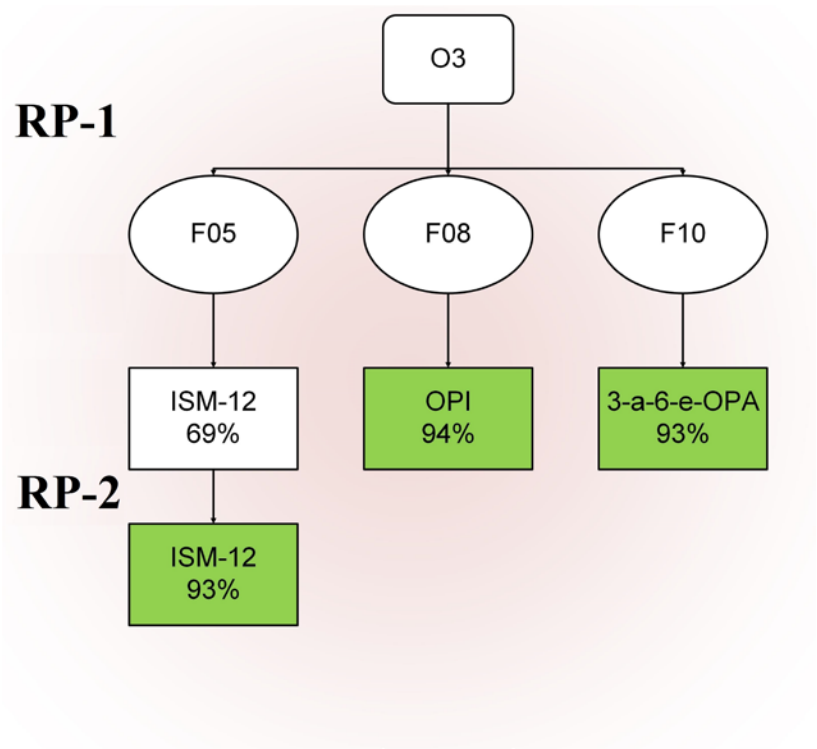
indokoltnak, melyet az RP-2 módszerrel valósítottunk meg (**28. ábra**). A minta kellően nagy tisztaságának köszönhetően az injektálási térfogatot 200 µl-re emeltük.




**28. ábra. O3-F5 frakció tisztítása RP-2 módszerrel.**

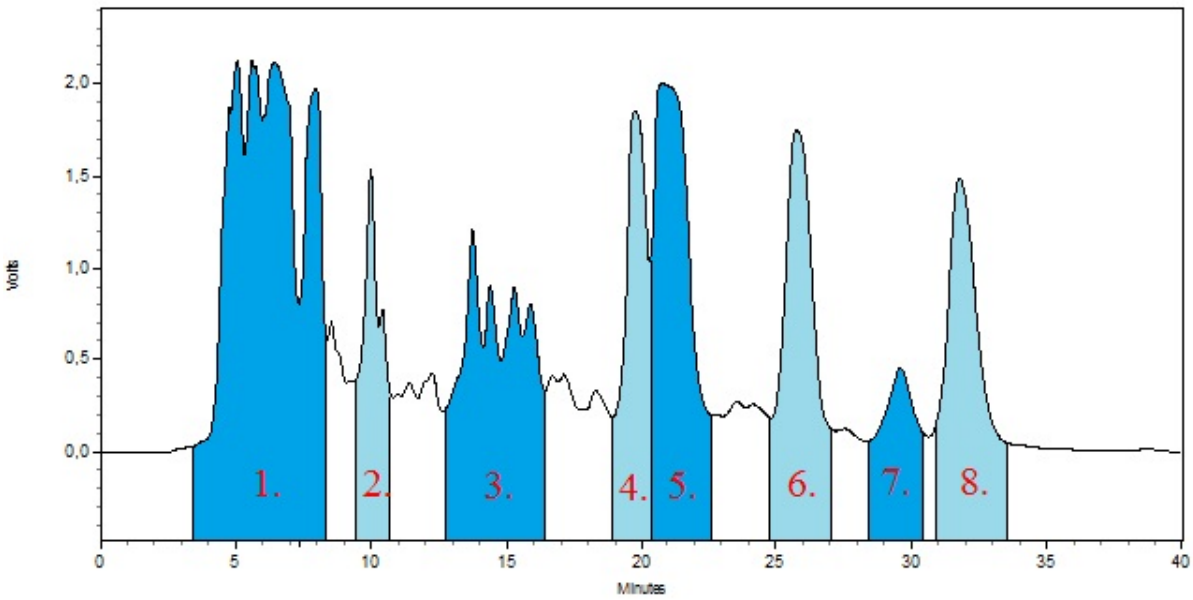
A tisztítással 92,62%-os tisztaságot sikerült elérni. Az így keletkezett ISM-12 jelű anyag tömege kisebb volt 5 mg-nál.

Az O3 sarzs tisztítása során tehát már az első lépésében 90% feletti tisztaságban sikerült kinyernünk két ismert ophiobolin származékot, az OPI-t, valamint a 3-a-6-e-OPA-t. Az F05 frakcióban fellelhető ISM-12 jelű vegyület ezen a preparatív munkák ezen fázisban 69%-os tisztaságú volt. Egy további RP-HPLC lépést követően azonban az ISM-12-t is sikerült mintegy 93%-os tisztaságban kinyernünk (**29. ábra**).




**29. ábra. Az O3 sarzs három frakciója tisztításának folyamatábrája. Az egyes vegyületek tisztasága %-os értékben látható.**

Az O4 sarzs potenciális ophiobolin származékainak tisztítását szintén az RP-1 módszerrel kezdtük meg 100 µl injektálási térfogat mellett. A folyamat során 8 frakció került gyűjtésre (**30. ábra**).




**30. ábra. O4 sarzs félpreparatív kromatogramja (RP-1 módszer).**

A fentieknek megfelelően ezen frakciókat is vízig pároltuk, majd EtOAc-os folyadék-folyadék extrakciót követően vákuum alatt szárazra pároltuk és analitikai mérleg segítségével meghatároztuk tömegüket.

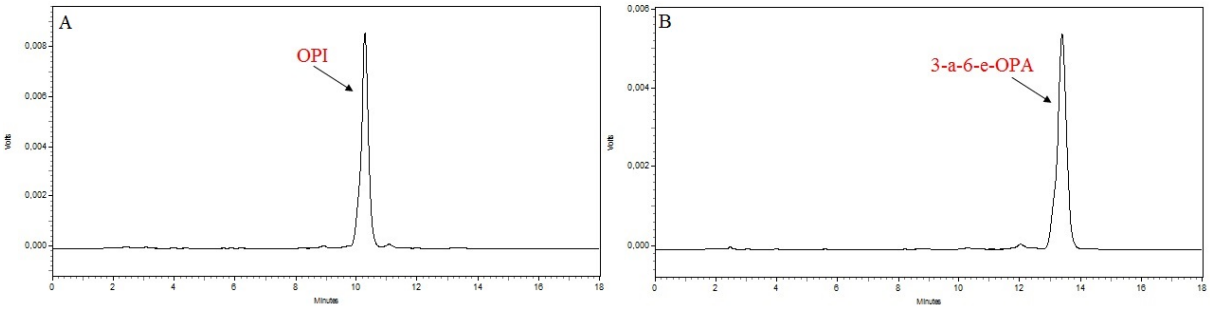
Az egyes frakciókat visszaoldottuk 3 ml MeCN-ben, és analitikai HPLC rendszeren ellenőriztük tisztaságukat. Az O4 sarzs frakcióinak fő alkotóit és tisztaságát a **14. táblázat** mutatja.

**14. táblázat. Az O4 sarzs frakcióinak összetétele és tisztasága.**

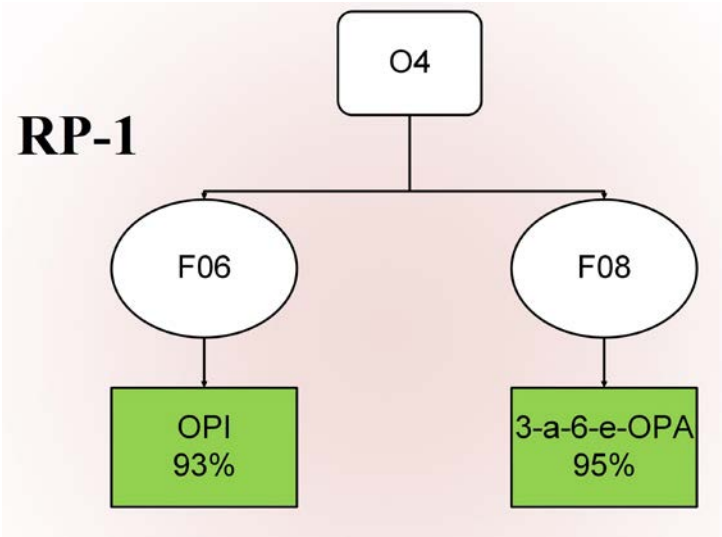
| *O4 sarzs frakciói* | *Termék tömege (mg)* | *Összetétel* | *Tisztaság [%]* |
|---|---|---|---|
| **O4-F1** | 80 | ISM-01 | 17,4 |
| | | ISM-02 | 18,5 |
| | | ISM-03 | 35,6 |
| | | ISM-04 | 4,4 |
| | | ISM-05 | 17,4 |
| **O4-F2** | 20 | ISM-06 | 63,8 |
| | | ISM-07 | 14,1 |
| **O4-F3** | 15 | ISM-08 | 31,6 |
| | | ISM-09 | 21,3 |
| | | ISM-10 | 32,4 |
| **O4-F4** | 10 | 6-e-OPA | 84,4 |
| **O4-F5** | 50 | OPA | 84,2 |
| **O4-F6** | 45 | OPI | 93,1 |
| **O4-F7** | - | 3-a-OPA | 85,7 |
| **O4-F8** | - | 3-a-6-e-OPA | 94,7 |

Az O4 sarzs félpreparatív tisztítása során az eddigiekkel ellentétben egyik frakció esetében sem tapasztaltunk kristályosodást, azonban két frakció tisztaságának ellenőrzésekor is nagy tisztaságú ismert ophiobolin analógokat sikerült azonosítanunk. A 6. frakcióból 45

mg, 93,1%-os OPI-t (**31. ábra-A**), míg a 8. frakcióból 94,7%-os 3-a-6-e-OPA-t nyertünk (**31. ábra-B**).




**31. ábra. A: Az O4 sarzsból tisztított OPI analitikai kromatogramja. B: Az O4 sarzsból tisztított 3-a-6-e-OPA analitikai kromatogramja.**




**32. ábra. Az O4 sarzs F04 és F08 frakciói tisztításának folyamatábrája. Az egyes vegyületek tisztasága %-os értékben látható.**

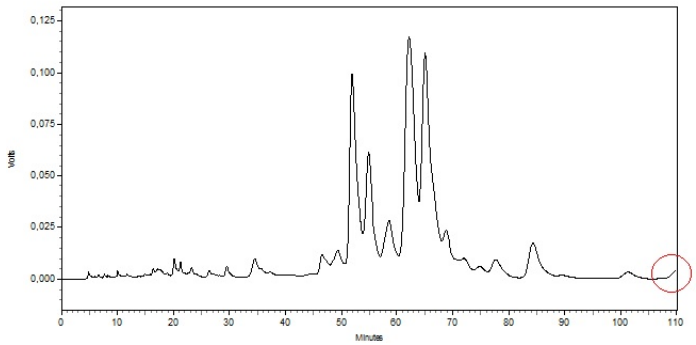
Összegezve az O4 sarzs tisztításának eddigi eredményeit, egy RP-HPLC lépésben nagy tisztaságban sikerült kinyernünk két, már ismert ophiobolin származékot, az OPI-t (93%), illetve a 3-a-6-e-OPA-t (95%) (**32. ábra**).

A fordított fázisú félpreparatív HPLC tisztítások során a kromatogramokon megjelenő komponenseket retenciós idejüknek megfelelően elneveztük az 5 ismert ophiobolin származékot tartalmazó standard törzsoldat segítségével. A három sarzs adatainak értékelése során 16 ismeretlen (ISM-01 – ISM-16) mintakomponenst, valamint 5 már ismert ophiobolin származékot különítettünk el (**15. táblázat**).

**15. táblázat. A tisztítás során azonosított ismert, valamint feltételezett ophiobolin származékok listája retenciós idejük sorrendjében. + jelöli az adott anyag meglétét, - jelöli az adott anyag hiányát.**

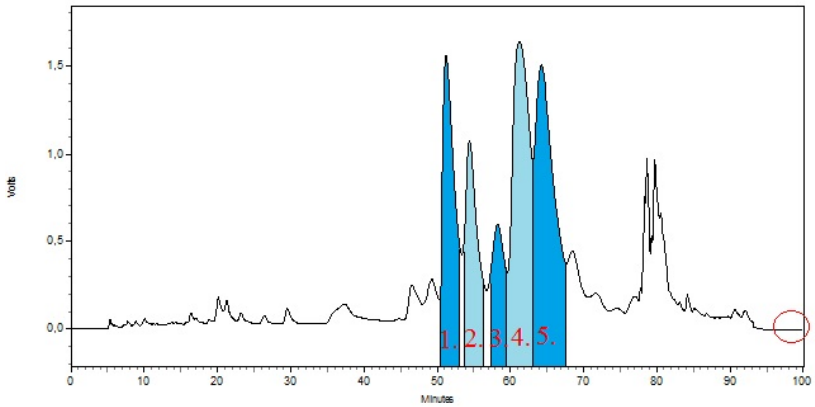
| | *Rt (perc)* | *O2 sarzs* | *O3 sarzs* | *O4 sarzs* |
|---|---|---|---|---|
| **ISM-01** | 1,71 | + | + | + |
| **ISM-02** | 2,04 | + | + | + |
| **ISM-03** | 2,41 | + | + | + |
| **ISM-04** | 2,91 | + | - | - |
| **ISM-05** | 3,13 | + | + | + |
| **ISM-06** | 4,05 | + | + | + |
| **ISM-07** | 4,47 | - | - | + |
| **ISM-08** | 5,70 | + | + | + |
| **ISM-09** | 6,00 | + | + | + |
| **ISM-10** | 6,20 | + | + | + |
| **ISM-11** | 6,40 | + | - | - |
| **ISM-12** | 6,60 | - | + | - |
| **ISM-13** | 8,00 | - | + | - |
| **6-e-OPA** | 8,50 | + | + | + |
| **OPA** | 9,20 | + | + | + |
| **ISM-14** | 9,50 | + | - | - |
| **ISM-15** | 10,01 | + | - | - |
| **OPI** | 10,67 | + | + | + |
| **ISM-16** | 10,86 | + | - | - |
| **3-a-OPA** | 12,50 | + | + | + |
| **ISM-17** | 12,60 | - | + | - |
| **3-a-6-e-OPA** | 13,90 | + | + | + |

Mindhárom sarzs esetében 5 perc után megfigyelhető volt egy 3-4 csúcsból álló csoport, ami az O2 és O3 sarzs esetében a negyedik frakció, míg az O4 sarzs esetében a harmadik frakciónak felelt meg. Ezeket a frakciókat egyesítettük (O2-F4 + O3-F4 + O4-F3 a továbbiakban E-ként fog szerepelni, az egyesített frakciók rövidítéseként), majd további tisztítási eljárásnak vetettük alá az RP-3 módszer alkalmazásával (**33. ábra**).




**33. ábra. Az egyesített frakciók félpreparatív tisztítása RP-3 módszerrel.**

A kromatogramon jól látható, hogy az elválasztás végén az oszlopról még eluálódott mintakomponens. Tekintettel arra, hogy a módszer igen hosszú (110 perc), valamint minden kromatográfiás elválasztás során biztosítani kell a vegyületek maradéktalan eluálását, egy gradiens elválasztás alkalmazását tartottuk szükségesnek (**34. ábra**).




**34. ábra. Az egyesített frakciók félpreparatív tisztítása RP-4 módszerrel.**

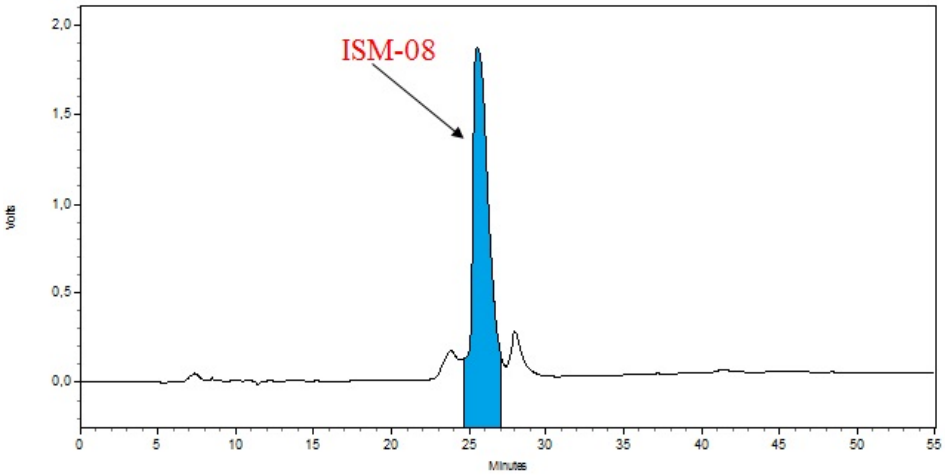
A gradiens programmal megvalósított elválasztás során a futásidő mindössze 10 perccel rövidült, azonban a korábban tapasztalt későn eluálódó mintakomponens már nem volt megfigyelhető az elválasztás végén, nem maradt szennyező komponens az oszlopon. További előnye volt ezen elúciós technikának, hogy a gyűjteni kívánt mintakomponensek felbontása csupán kis mértékben romlott az izokratikus elválasztáshoz képest, azonban a félpreparatív célú tisztításra továbbra is megfelelt. 5 frakció gyűjtését valósítottuk meg.

Az RP-4 módszerrel 5 frakciót szedtünk, melyeket EtOAc segítségével extraháltuk, vákuum alatt szárazra pároltuk és megmértük a tömegüket (**16. táblázat**). A kiértékelés során csupán 3 fő csúcsot azonosítottunk (ISM-08, ISM-09 és ISM-10). A 3. és 4. frakciókban jelen lévő ISM-10 jelű vegyület további tisztítását, tekintettel azok mennyiségére, mellőztük.

**16. táblázat. Az egyesített frakciók tisztítása során nyert alfrakciók tömege, összetétele és tisztasága.**

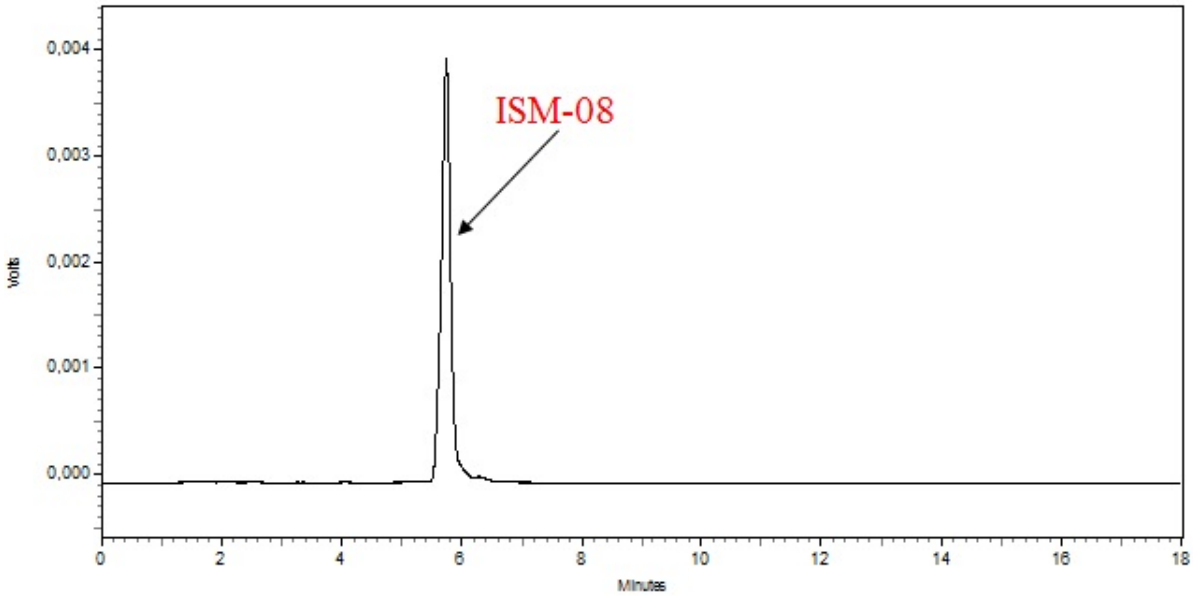
| | *Termék tömege (mg)* | *ISM-08* | *ISM-09* | *ISM-10* | *ISM-11* | *ISM-12* | *ISM-15* | *OPI* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **E-F1** | 15 | 83,99 | | 12,11 | | | | 0,51 |
| **E-F2** | 10 | 23,52 | 56,57 | 3,19 | | 4,78 | | 0,8 |
| **E-F3** | 10 | 3,72 | 7,9 | 42,67 | | | | 1,5 |
| **E-F4** | 15 | 6,76 | 4,46 | 52,37 | 27,73 | 1,94 | | 5,15 |
| **E-F5** | 35 | 1,08 | 76,59 | 5,8 | 7,9 | | 5,48 | |

A frakciók közül az elsőben és az ötödikben sikerült viszonylag nagy tisztaságban kinyerni az ISM-08 és ISM-09 jelű anyagokat, melyek további tisztítását az RP-2 módszerrel végeztük el (**35. ábra**).




**35. ábra. ISM-08 félpreparatív tisztítása során rögzített kromatogram (RP-2 módszer).**

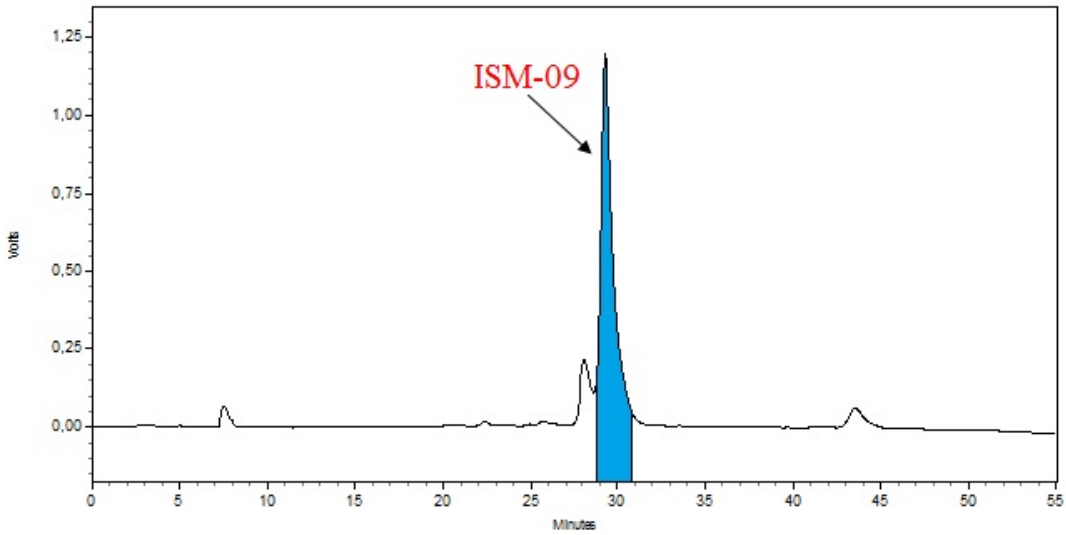
A tisztítás során 10 mg ISM-08 jelű anyagot nyertünk. Ezt visszaoldottuk 2 ml acetonitrilben és ellenőriztük a tisztaságát (**36. ábra**).




**36. ábra. ISM-08 jelű potenciális ophiobolin származék tisztaságának ellenőrzése analitikai HPLC-n.**

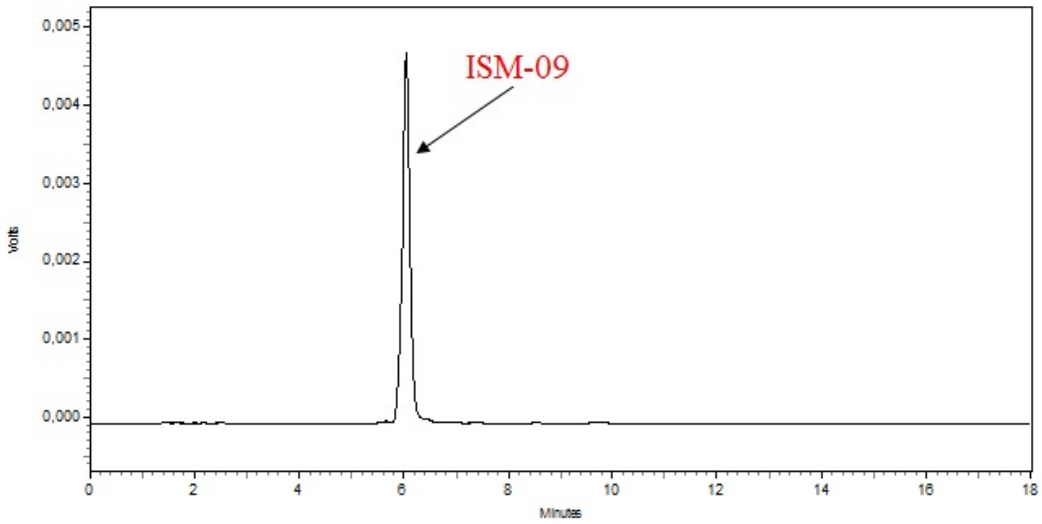
A fenti ábrán látható egy viszonylag tiszta frakció, amely egyetlen fő csúcsot tartalmaz, tisztasága 97,81%-nak bizonyult.

Mivel az 1. frakciót az RP-2 módszerrel sikeresen tisztítani tudtuk, ugyanezt a módszert alkalmaztuk az 5. frakcióban jelen lévő ISM-09 jelű anyag tisztítására is (**37. ábra**).

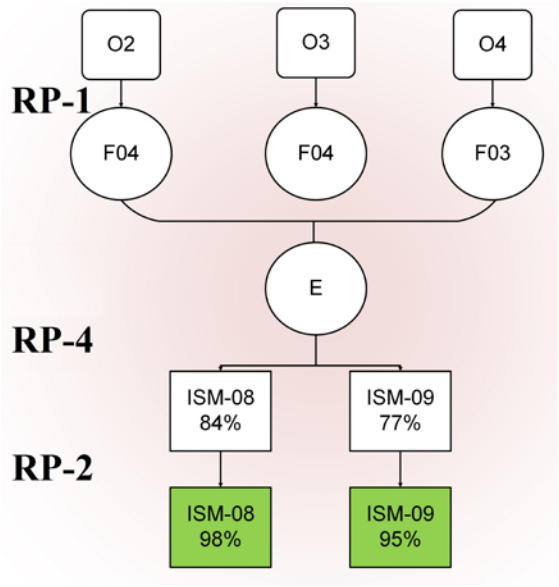



**37. ábra. ISM-09 jelű vegyület tisztítása RP-2 módszerrel.**

Az általunk gyűjtött frakciók egyesítése után analitikai oszlopon ellenőriztük annak összetételét (**38. ábra**), és megállapítottuk, hogy a tisztított ISM-09 jelű vegyület tisztasága 95,24%-os volt.




**38. ábra. Tisztított ISM-09 anyag analitikai kromatogramja.**




**39. ábra. Az O2, O3 és O4 sarzsok további tisztításának folyamatábrája. Az egyes vegyületek tisztasága %-os értékben látható.**

Összegezve a preparatív tisztítások végső szakaszát, az O2, O3 és O4 sarzsok tisztítása során a korai frakciók összetétele közel azonos volt, így ezeket a frakciókat egyesítettük, majd két egymást követő RP-HPLC tisztításai lépésben további két potenciális ophiobolin

származékot sikerült kinyernünk, az ISM-08-at 98%, míg az ISM-09-et 95% tisztaágban (**39. ábra**).

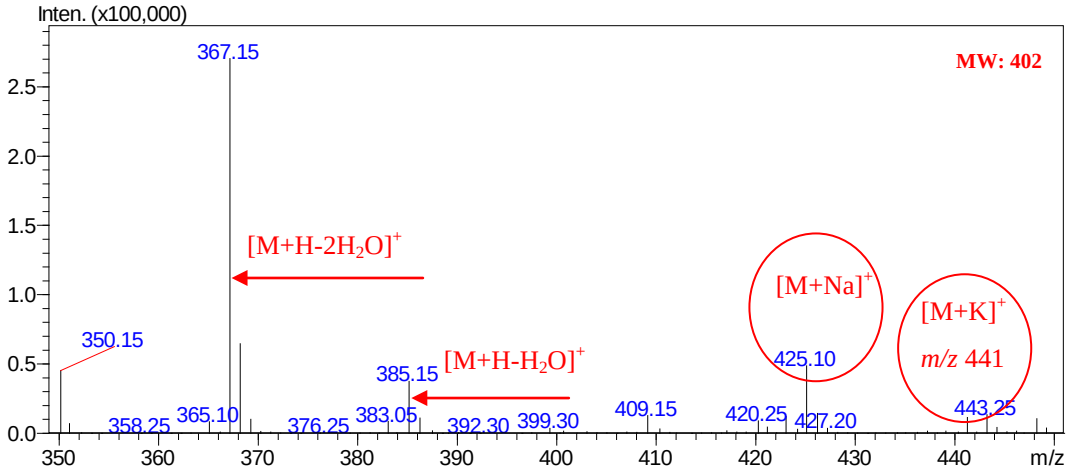
Összegezve az O2, O3 és O4 sarzsok fordított fázisú HPLC tisztítását kijelenthetjük, hogy a *B. oryzae* SZMC 24163 nyers extraktumának félpreparatív tisztítását sikeresen megvalósítottuk, és több esetben nagy tisztaságú anyagot sikerült kinyernünk már egyetlen tisztítási lépéssel is. Az eddig általunk tisztított ophiobolin származékokon felül további 5 eddig még nem azonosított vegyületet sikerült tisztítanunk. A kellően pontos frakciószedés következtében több esetben kristályosítottuk a frakcionálni kívánt mintakomponenseket, nagyban felgyorsítva ezáltal a tisztítási munkákat.

## 6.6 Az O2, O3 és O4 sarzsból tisztított vegyületek további vizsgálatai

### *6.6.1 Tömegspektrometriás vizsgálatok*

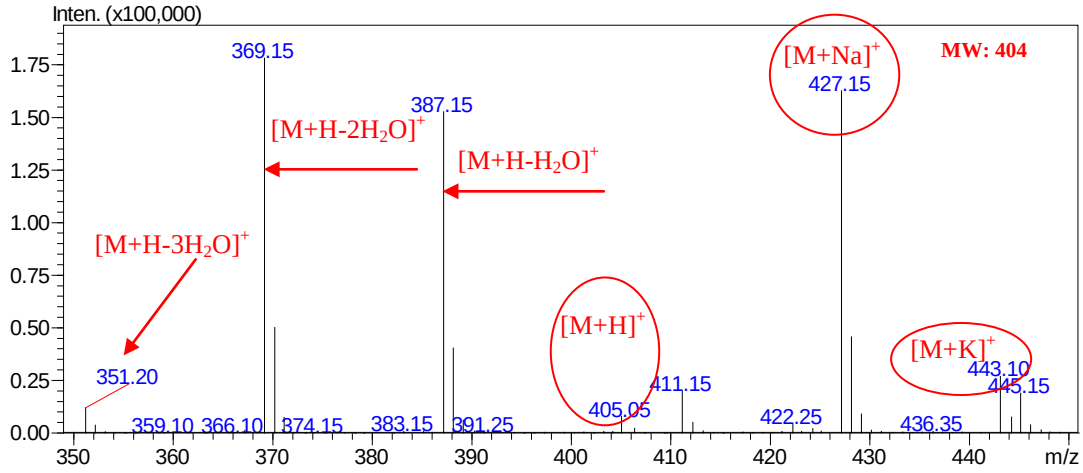
A tisztított vegyületek molekulatömegének meghatározását LCMS-2010A HPLC-MS rendszeren valósítottuk meg.

Az ISM-08 jelű tisztított vegyület tömegspektrumán megfigyelhetők az ophiobolinokra jellemező karakterisztikus ionok (**40. ábra**). A minta pozitív ESI scan tömegspektrumán jól látszanak az oldószerek alkáli fém szennyezéséből származó $Na^+$ és $K^+$ adduktok, rendre *m/z* 425, illetve *m/z* 441 értékeknél. Az O1 sarzsból tisztított ophiobolin származékok tömegspektrometriás vizsgálatánál tapasztaltakhoz hasonlóan az ISM-08 potenciális ophiobolin származék esetében sem látható az $[M+H]^+$ molekulaion. Jelentős intenzitással láthatók még a vízkilépéssel keletkező ionok az *m/z* 385 ($[M+H-H_2O]^+$) és *m/z* 367 ($[M+H-2H_2O]^+$) értékeknél. Mindezek alapján az ISM-08 jelű tisztított vegyület várható molekulatömege 402. Napjainkig a szakirodalomban csak három vegyületet, az OPB-t (Canonica és mtsi. 1966), az OPB-laktont (Li és mtsi. 1995) és a (6α)-18,19,21,21-O-tetrahidro-18,19-dihidroxiophiobolin G-t (Liu és mtsi. 2011) írták le ilyen tömeggel.




**40. ábra. ISM-08 jelű tisztított vegyület pozitív ionizációs módban felvett ESI-SCAN tömegspektruma.**

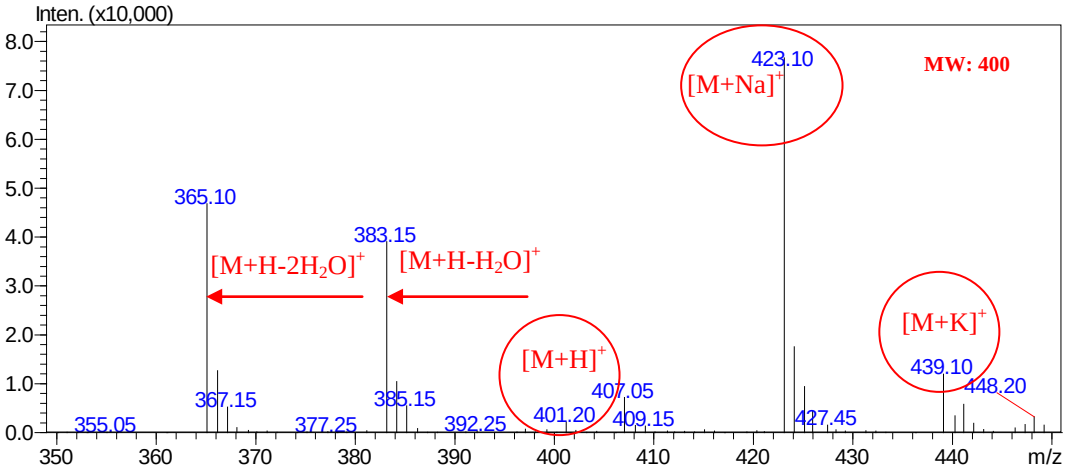
Az ISM-09 jelű potenciális ophiobolin származék ESI-SCAN spektrumán kis intenzitással ugyan, de megfigyelhető a molekulaion ($[M+H]^+$, *m/z* 405), valamint jól láthatók az alkáli fém adduktok is ($[M+Na]^+$, *m/z* 427, illetve $[M+K]^+$, *m/z* 443). A fentiekhez hasonlóan nagy intenzitással figyelhetők meg a vízvesztéssel keletkező ionok ($[M+H-H_2O]^+$, *m/z* 387; $[M+H-2H_2O]^+$, *m/z* 369; $[M+H-3H_2O]^+$, *m/z* 351) is. Mindezeket figyelembe véve az általunk tisztított vegyület várható molekulatömege 404 (**41. ábra**), ami a szakirodalmi ismereteink alapján arra enged következtetni, hogy egy eddig még le nem írt ophiobolin származék tisztítását valósítottuk meg, azonban ennek megerősítésére további szerkezetvizsgálatok szükségesek.




**41. ábra. ISM-09 jelű tisztított vegyület pozitív ionizációs módban felvett ESI-SCAN tömegspektruma.**

Az ISM-12 jelű anyag tömegspektrumának (**42. ábra**) elemzése során a fentiekhez hasonló karakterisztikus ionok megjelenését sikerült detektálni. Jelentős intenzitással figyelhetők meg a fém adduktok ($[M+Na]^+$ *m/z* 423, $[M+K]^+$ *m/z* 439), illetve a vízvesztést

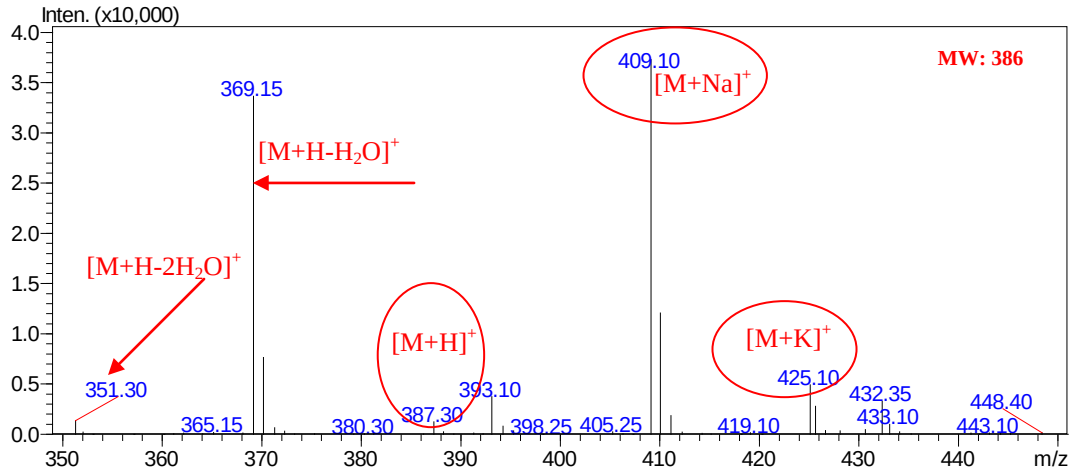
jelző ionok ([M+H-$H_2O$]$^+$, *m/z* 383; [M+H-2$H_2O$]$^+$, *m/z* 365). Az ISM-09-hez hasonlóan a molekulaion ([M+H]$^+$, *m/z* 401) kis intenzitással ugyan, de látható. Ezen karakterisztikus ionok alapján az ISM-12 feltételezett molekulatömege 400. Az irodalmi adatok alapján ez a vegyület az alábbi ophiobolinok egyike lehet: OPA-lakton (Rossi és mtsi. 1978), ophiobolin D (Itai és mtsi. 1967), 25-OH-OPI (Sugawara és mtsi. 1987), OPJ (Sugawara és mtsi. 1988), 8-*epi*-ophiobolin-J (Sugawara és mtsi. 1988), (5α,6α)-5-O-metilophiobolin H (Liu és mtsi. 2011), 5-O-metilophiobolin H (Liu és mtsi. 2011), ophiobolin P (Wang és mtsi. 2013) vagy ophiobolin Q (Wang és mtsi. 2013), esetleg egy eddig még nem dokumentált ismeretlen ophiobolin származék. Az OPA és 6-e-OPA vegyületek szintén ilyen tömeggel rendelkeznek, de retenciós idejük alapján kizártuk őket a potenciális jelöltek közül. Ha figyelembe vesszük a szakirodalomban már publikált, *B. oryzae*ből tisztított ophiobolin származékokat, akkor a 25-OH-OPI, az OPJ és a 8-e-OPJ egyaránt valószínű jelölt lehet ezen ismeretlen ophiobolin analógra. Mindazonáltal a tisztított vegyület kilétének pontos megállapításához a szerkezetvizsgálati kísérleteket megkezdtük.



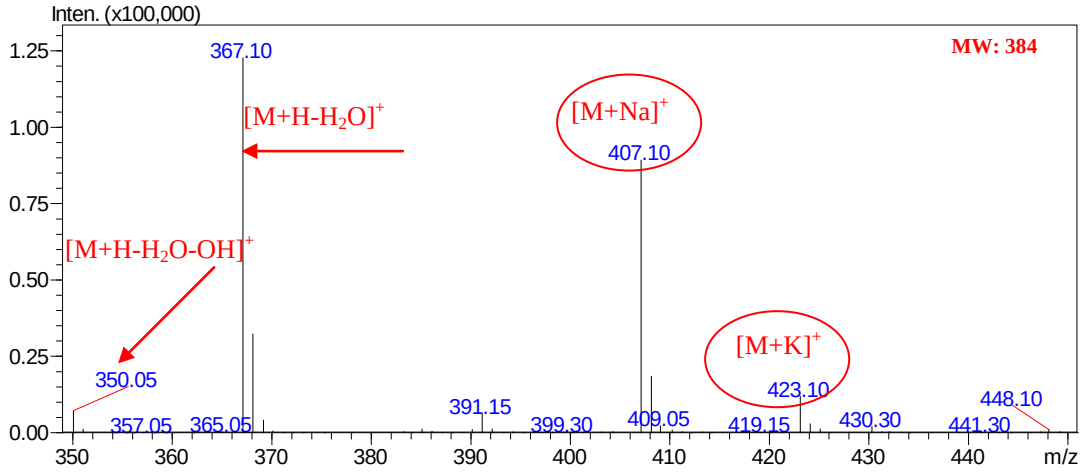

**42. ábra. ISM-12 jelű tisztított vegyület pozitív ionizációs módban felvett ESI-SCAN tömegspektruma.**

Az ISM-14 (**43. ábra**) és ISM-15 (**44. ábra**) jelű vegyületek az eddigiekhez hasonló tömegspektrometriás viselkedést mutatnak. Nagy intenzitással figyelhetők meg a ([M+Na]$^+$ *m/z* 409 és *m/z* 407), valamint a ([M+K]$^+$ *m/z* 425 és *m/z* 423) ionok egyaránt. ISM-14 esetében jól látszanak a vízvesztésre utaló ionok ([M+H-$H_2O$]$^+$, *m/z* 369; [M+H-2$H_2O$]$^+$, *m/z* 351). ISM-15 esetében az ([M+H-$H_2O$]$^+$, *m/z* 367) ion mellett egy *m/z* 365 ion látható ([M+H-$H_2O$-OH]$^+$). Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy az ISM-14 molekulatömege 386, míg az ISM-15 molekulatömege 384. A rendelkezésünkre álló irodalmi adatok alapján az ISM-14 vegyület feltehetően az OPC (Nozoe és mtsi. 1966), a 6-e-OPC (Tsipouras és mtsi. 1996), az

OPH (Cutler és mtsi. 1984), az (5α,6α)-ophiobolin H (Liu és mtsi. 2011) az ophiobolin U (Liu és mtsi. 2013) vagy egy új ophiobolin származék valamelyike lehet, míg az ISM-15 a 6-e-3-a-OPB (Shen és mtsi. 1999), a 6-*epi*-ophiobolin I (Sugawara és mtsi. 1988), a 8-dezoxiophiobolin J (Sugawara és mtsi. 1988), az OPK (Singh és mtsi. 1991), a 6-e-OPK (Singh és mtsi. 1991), az OPM (Tsipouras és mtsi. 1996), a 6-e-OPM (Tsipouras és mtsi. 1996) vagy egy eddig még le nem írt ophiobolin származék egyikének feleltethető meg. Bár az OPI szintén ilyen tömeggel rendelkezik, de a HPLC elválasztás során tapasztalt retenciós idő alapján kizárhatjuk a potenciális jelöltek sorából.



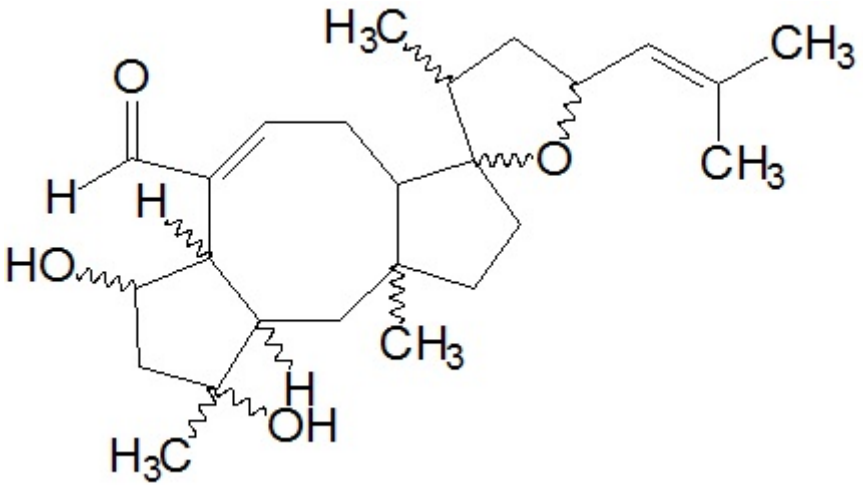

**43. ábra. ISM-14 jelű tisztított vegyület pozitív ionizációs módban felvett ESI-SCAN tömegspektruma.**




**44. ábra. ISM-15 jelű tisztított vegyület pozitív ionizációs módban felvett ESI-SCAN tömegspektruma.**

### *6.6.2 NMR vizsgálatok*

Az O2, O3 és O4 sarzsokból tisztított vegyületek tömegspektrumai alapján feltételeztük, hogy azok szintén ophiobolin származékok. Ennek megállapításához szükség volt szerkezetük pontos megállapítására. A félpreparatív munkák során azonban az ISM-08 jelű vegyületből sikerült nagyobb, NMR vizsgálatokhoz elegendő mennyiséget tisztítani. Az ISM-08 $^{13}C$ NMR, valamint $^{1}H$ NMR spektrumai alapján (**26. Melléklet**) megerősítést nyert, hogy az általunk tisztított és HPLC, valamint HPLC-MS mérések alapján ophiobolin analógnak vélt anyag valóban az (**45. ábra**). Az NMR vizsgálatok során a felvett spektrumok alapján megállapítottuk, hogy az általunk tisztított ISM-08 egy eddig még nem publikált ophiobolin származék. A vegyület szerkezetének pontos megállapításához további NMR vizsgálatok szükségesek.




**45. ábra. ISM-08 ophiobolin származék NMR mérések szerinti szerkezeti képlete.**

## 6.7 Tenyésztési körülmények optimalizálása

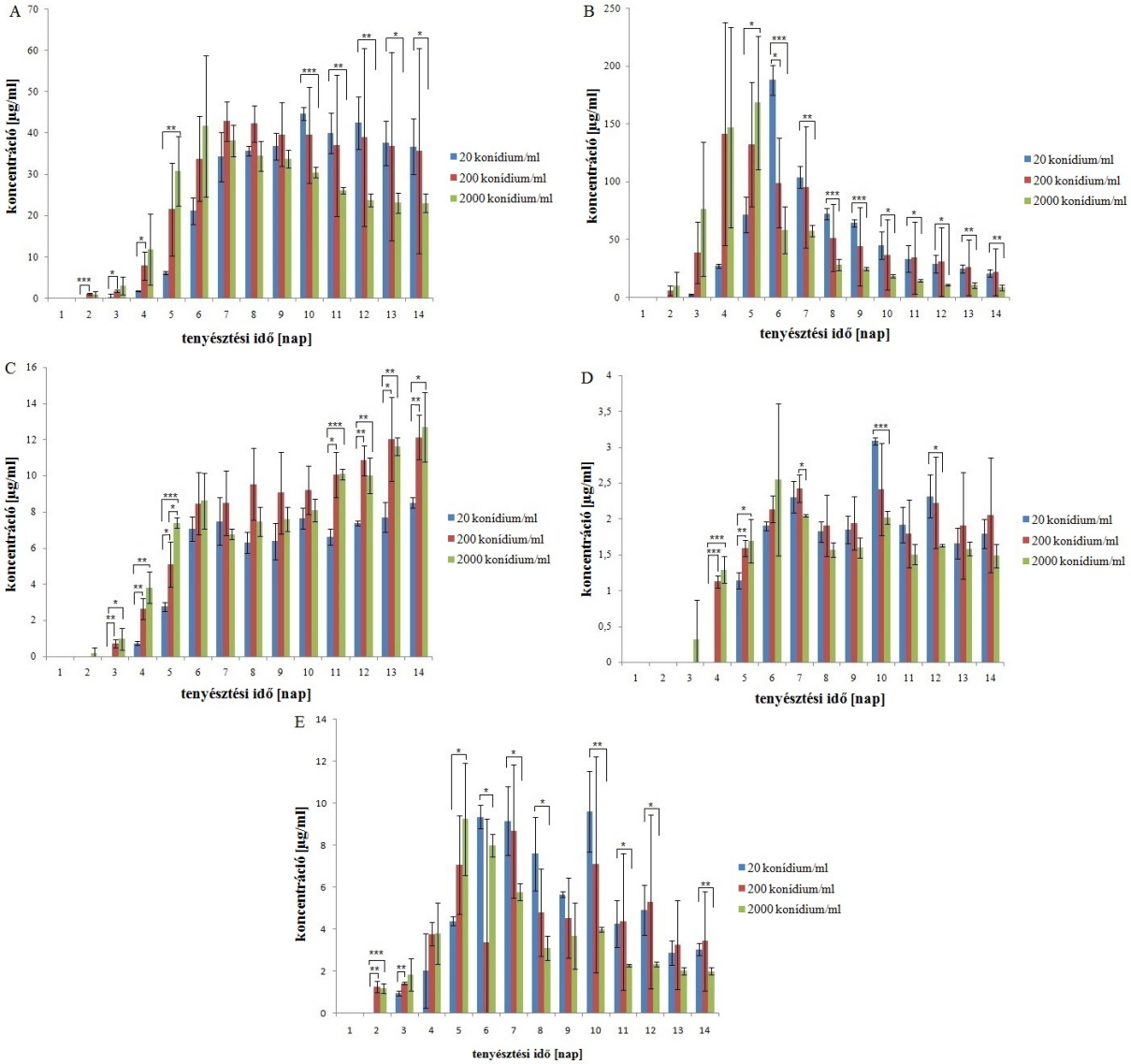
Ophiobolinok félpreparatív tisztításának érdekében a *B. oryzae* SZMC 24163 jelű törzsének optimális tenyésztési körülményeinek meghatározását végeztük el. Első lépésként két eltérő inokulálási eljárás, a konídiumszuszpenzióval, illetve az agardugóval történő leoltás összehasonlításával igyekeztünk választ adni arra kérdésre, hogy a leoltás módja befolyásolja-e az ophiobolinok termelésének mértékét, és ha igen, milyen mértékben. Ezt követően a tenyésztési hőmérséklet ophiobolintermelésre gyakorolt hatását vizsgáltuk 4 különböző hőmérsékleten, majd végül arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a különböző szénforrások milyen hatást gyakorolnak ezen vegyületek termelődésére.

### *6.7.1 Konídiumszuszpenzióval történő leoltás*

A *B. oryzae* SZMC 24163 jelű törzsét PDA ferde agaron történő előtenyésztést követően 2x10, $2x10^2$ és $2x10^3$ konídium/ml végkoncentrációban oltottuk le PDB tápoldatba.

A termelt 6-e-OPA mennyisége 2x10 konídium/ml koncentráció esetén a 10. napon mutatott maximum értéket, majd ezt követően lassú csökkenést figyelhettünk meg (**46. ábra-A**). A $2x10^2$, illetve $2x10^3$ konídium/ml végkoncentrációk esetében ez a termelési maximum rendre a tenyésztés 7., illetve 6. napján jelentkezett. A termelt 6-e-OPA maximális mennyisége mindhárom leoltási végkoncentráció esetében közel azonosnak bizonyult (42-45 µg/ml). Az OPA esetében a legnagyobb hozamot a 2x10 konídium/ml végkoncentrációjú leoltás eredményezte (188 µg/ml). Ez a maximum érték a tenyésztés 6. napján volt megfigyelhető, majd ezt követően gyors csökkenést tapasztaltunk. A töményebb leoltási végkoncentrációk esetében a termelt OPA mennyisége a 4., illetve 5. napon érte el maximumát, azonban a mért OPA koncentrációk elmaradtak a 2x10 konídium/ml végkoncentrációjú leoltás esetén tapasztaltaktól (**46. ábra-B**). Az OPI termelési kinetikáját vizsgálva megállapítható, hogy a 14 napos tenyésztési időszak alatt termelt OPI mennyisége folyamatosan növekvő tendenciát mutat mindhárom leoltási koncentrációban (**46. ábra-C**). Ezen ophiobolin származék esetében a maximális hozamot a töményebb leoltások eredményezték. A 3-a-OPA fermentléből mért koncentrációja a tenyésztés 10. napján bizonyult a legnagyobbnak a leghígabb leoltási végkoncentráció esetén (**46. ábra-D**). A $2x10^2$ és $2x10^3$ konídium/ml leoltási végkoncentrációk a tenyésztés 7., illetve 6. napján eredményeztek maximális 3-a-OPA szintet. Hasonló trendet lehet felfedezni a 3-a-6-e-OPA

termelési kinetikájában is. A 2x10 konídium/ml végkoncentrációjú leoltás ezen vegyület esetében is a 10. napon eredményezte a legnagyobb termelt 3-a-6-e-OPA mennyiséget (9,6 µg/ml), míg ez a maximum $2x10^2$ konídium/ml esetében a tenyésztés 7. napján (8,6 µg/ml), a $2x10^3$ konídium/ml koncentrációjú leoltás esetében pedig a tenyésztés 5. napján (9,2 µg/ml) jelentkezett (**46. ábra-E**).




**46. ábra. Az ophiobolinok termelési kinetikájának változása három különböző végkoncentrációjú konídium szuszpenzióval történő leoltás során 6-e-OPA (A), OPA (B), OPI (C), 3-a-OPA (D), 3-a-6-e-OPA (E).**

*** p<0,05;** p<0,01; *** p<0,001**

Érdekes tény, hogy a tenyésztési időszak első 5 napján a termelt ophiobolinok mennyisége a $2x10^3$ konídium/ml végkoncentráció esetén minden esetben nagyobbnak bizonyult, a hígabb leoltásoknál mért értékeknél. Ez a trend az OPA és a 3-a-6-e-OPA

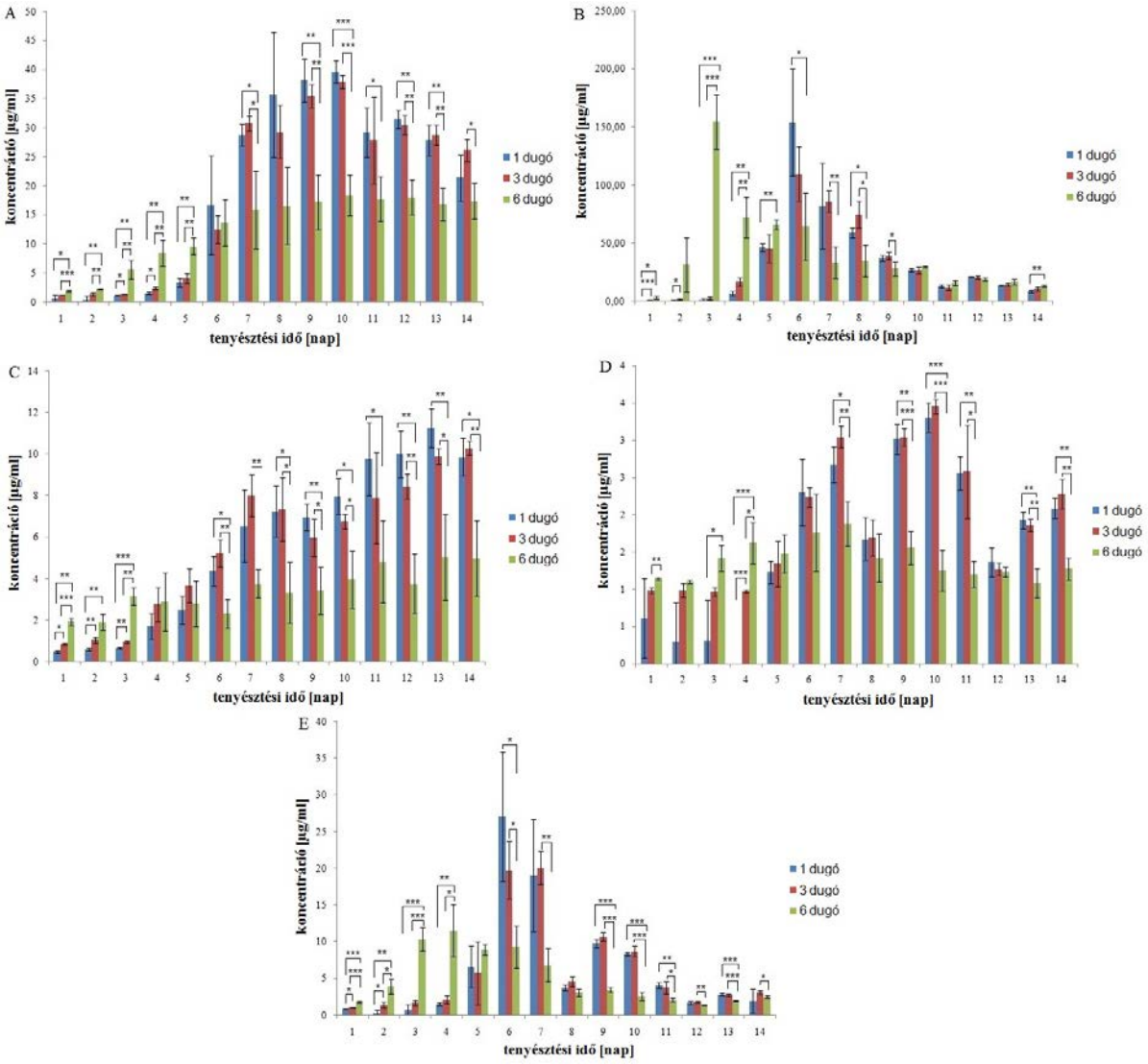
esetében a 6., míg a másik három ophiobolin származék esetén a 7. naptól megváltozott és a folyamatosan csökkenő ophiobolin mennyiség csupán 50-80%-a volt a hígabb leoltásoknál mért mennyiségeknél. A legnagyobb ophiobolin hozamot a 2x10 konídium/ml leoltási végkoncentráció alkalmazása során sikerült elérnünk, ekkor a 6. napon mintegy 11 mg termelt ophiobolint mutattunk ki a fermentléből. Ezt követően az ophiobolinok mennyisége az OPI kivételével folyamatos csökkenésnek indult, és nem tapasztaltunk számottevő különbséget a $2x10^2$ konídium/ml koncentrációnál mért értékekhez képest. Ez az érték bár közel azonos a $2x10^3$ konídium/ml koncentrációnál mért értékkel, azonban figyelembe véve a tömény leoltás 7-14 napján mért alacsony ophiobolin mennyiségeket, kijelenthetjük, hogy a hígabb konídium szuszpenzióval történő leoltás a legoptimálisabb az ophiobolinok nagy mennyiségben történő preparatív célú termeltetéséhez.

### *6.7.2 Agardugóval történő leoltás*

A *B. oryzae* SZMC 24163 törzsének előtenyésztését PDA táptalajon végeztük és a PDB tápoldat leoltását ezen tenyészetből kivágott agardugókkal (1, 3 és 6 agardugó) valósítottuk meg. Az ophiobolinok termelését napi mintavételezéssel monitoroztuk.

A vizsgálat során a konídiumos leoltásokhoz hasonló termelési kinetikákat tapasztaltunk (**47. ábra**). A termelt 6-e-OPA mennyisége az 1, illetve 3 agardugóval történő leoltás esetén a 10. napon mutatott maximum értéket (40 µg/ml, illetve 38 µg/ml), majd ezt követően lassú csökkenés volt megfigyelhető (**47. ábra-A**). A 6 agardugóval történő leoltás esetében ez a termelési maximum szintén a tenyésztési időszak 10. napján jelentkezett, azonban a termelt 6-e-OPA mennyisége szignifikánsan kisebbnek bizonyult a másik két leoltási körülmény során tapasztaltaknál (18 µg/ml). Az OPA esetében a legnagyobb hozamot az 1 agardugóval történő leoltás eredményezte (154 µg/ml) a tenyésztési időszak 6. napján, azonban érdekes módon a 6 agardugós leoltás esetében a tenyésztés 3. napján kiugróan magas OPA szintet mértünk (154 µg/ml). Ezt követően mindkét esetben gyors csökkenést tapasztaltunk a termelt OPA mennyiségében, ami a 14. napra 10 µg/ml körüli értékre süllyedt. A 3 agardugóval történő leoltás OPA termelési kinetikája igen hasonlónak bizonyult ez előzőekhez, a legnagyobb mért koncentrációt ebben az esetben is a 6. napon figyelhettük meg, mértéke azonban jelentősen elmaradt a másik két leoltás során tapasztaltaktól (109 µg/ml) (**47. ábra-B**). Az OPI termelési kinetikája a konídium szuszpenzióval történő leoltáshoz hasonlóan folyamatosan növekvő tendenciát mutatott mindhárom leoltási koncentrációban

(**47. ábra-C**). Ezen ophiobolin származék esetében a maximális hozamot a hígabb leoltások eredményezték, 11 µg/ml az 1 agardugós, míg 10 µg/ml a 3 agardugós leoltás esetén. A legnagyobb termelt OPI mennyiséget a tenyésztés 13. napján sikerült detektálni.




**47. ábra. Az ophiobolinok termelési kinetikájának változása agadugóval történő leoltás során. 6-e-OPA (A), OPA (B), OPI (C), 3-a-OPA (D), 3-a-6-e-OPA (E).**
*** p<0,05;** p<0,01; *** p<0,001**

A 3-a-OPA fermentléből mért koncentrációja a tenyésztés 10. napján bizonyult a legnagyobbnak a hígabb leoltási végkoncentrációk esetében (**47. ábra-D**). A 6 agardugóval történő leoltás a tenyésztés 7. napján eredményezett maximális 3-a-OPA mennyiséget, azonban ez az érték közel fele akkorának bizonyult (1,8 µg/ml), mint a hígabb leoltások során tapasztalt maximális 3-a-OPA koncentrációk. Az 1, valamint a 3 agardugós leoltások

hasonlóan a konídium szuszpenzióval történő leoltásokhoz a tenyésztés 7., illetve 6. napján eredményeztek maximális 3-a-6-e-OPA szintet (27 µg/ml, illetve 20 µg/ml). Ezt követően a termelt ophiobolin származék mennyisége jelentős mértékben csökkent és a tenyésztési időszak végén mintegy 2-3 µg/ml koncentrációt mutattak. A 6 agardugóval történő leoltás kinetikája hasonló képet mutatott a hígabb leoltásokéhoz, azonban a termelt 3-a-6-e-OPA mennyisége alacsonyabbnak bizonyult, valamint a termelési maximuma (11 µg/ml) már a tenyésztési időszak 4. napján megfigyelhető volt. (**47. ábra-E**).

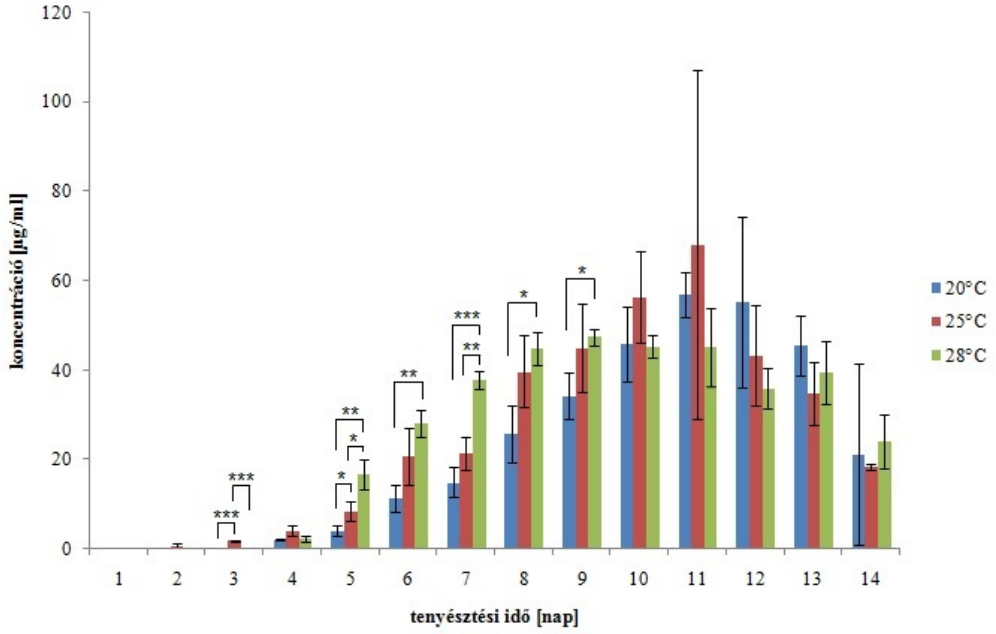
Összehasonlítva a két eltérő leoltási módszert, megállapítható, hogy a 2x10 végkoncentrációjú konídium szuszpenzióval történő leoltás a termelt ophiobolinok mennyiségét illetően alkalmasabb lehet ezen másodlagos metabolitok termeltetésére, mint az agardugóval történő leoltás, habár a két módszer által biztosított teljes ophiobolin mennyiség mindössze 11%-os eltérést mutatott.

### *6.7.3 Tenyésztési hőmérséklet hatása az ophiobolintermelésre*

Az ophiobolinok preparatív célú optimális tenyésztési körülményeinek meghatározása következő lépéseként megvizsgáltuk a hőmérséklet hatását az egyes ophiobolin származékok termelésére. Az előzőekben tárgyalt eredmények tükrében a leoltást 2x10 végkoncentrációjú konídium szuszpenzióval valósítottuk meg.

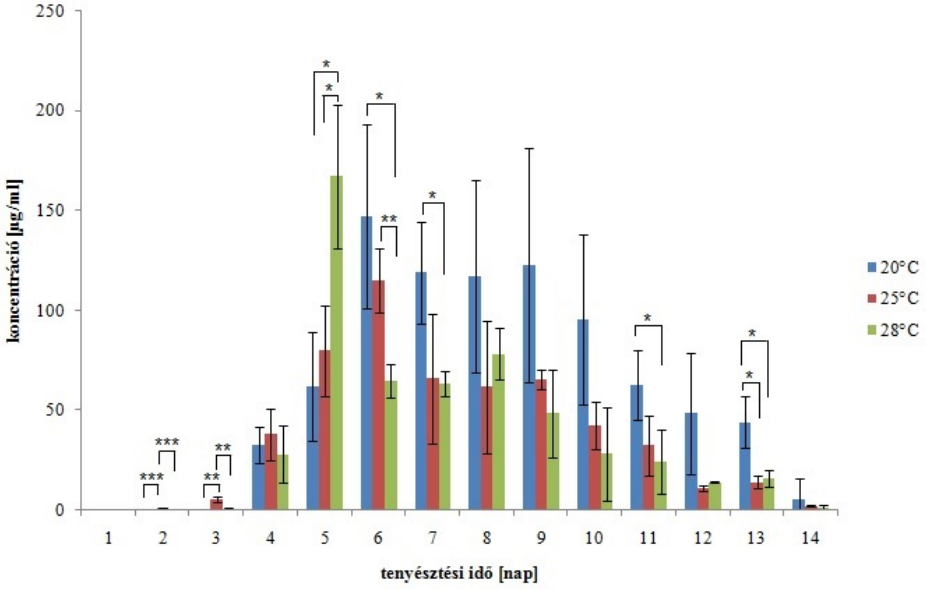
A tenyésztési hőmérséklet optimalizálása során a 37 °C -on inkubált tenyészetek sem micéliális növekedést, sem pedig ophiobolintermelést nem mutattak. A továbbiakban részletes bemutatásra kerülnek az egyes ophiobolin származékok hőmérsékletfüggő termelési kinetikái, melyekből jól látszik, hogy a termelési maximum első sorban az OPA, míg a második maximumos érték a 6-e-OPA jelenlétének köszönhető.

A 6-e-OPA mindhárom vizsgált tenyésztési hőmérsékleten (20 °C, 25 °C, 28 °C) hasonló termelési kinetikát mutatott (**48. ábra**). Az inkubációs időszak negyedik napját követően folyamatos emelkedést lehetett tapasztalni a fermentlében mért 6-e-OPA koncentrációkban, mely 20 °C-on és 25 °C-on a 11. napon érte el maximumát (57 µg/ml és 68 µg/ml). A 28 °C-os tenyésztési hőmérsékleten ezt a maximum értéket (47 µg/ml) a 9. napon figyeltük meg. Mindhárom vizsgált hőmérsékleten a maximum érték megjelenését követően csökkenő tendenciát tapasztaltunk a 6-e-OPA koncentrációjában.




**48. ábra. 6-e-OPA termelési kinetikája három különböző tenyésztési hőmérsékleten.**
*** p<0,05;** p<0,01; *** p<0,001**

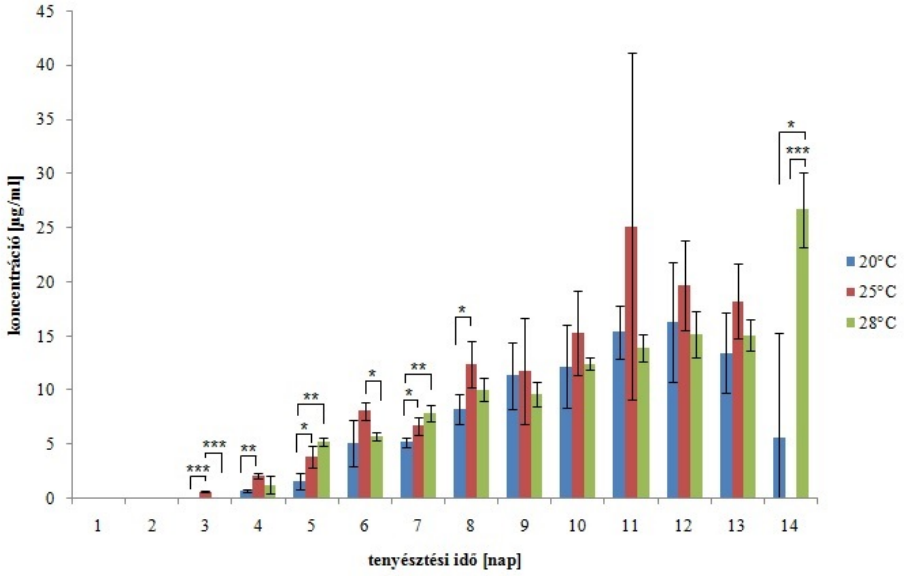
OPA esetében a 28 °C-on történt tenyésztés 5. napján detektáltuk a legnagyobb OPA koncentrációt (167 µg/ml), majd ezt követően a vizsgált vegyület fermentlében mért koncentrációja közel harmadára csökkent. Egy három napos konstans szakaszt követően folyamatos csökkenésnek indult, és az inkubációs időszak végére 1,3 µg/ml értékre apadt (**49. ábra**). A 20 °C- és 25 °C-os tenyésztési hőmérsékleteken az OPA maximum a 6. napon jelent meg rendre 147 µg/ml és 115 µg/ml koncentrációkkal. A termelési kinetika a 28 °C-on mérteknek megfelelően változott azzal az eltéréssel, hogy termelési maximumot követő napon 20 °C-on 19%, míg 25 °C-on 43% csökkenést mértünk az OPA koncentrációjában. Mindhárom vizsgált tenyésztési hőmérséklet eredményei alapján megállapítható, hogy az OPA termelés az 5-6. napon érte el maximumát, majd egy rövid plató fázist követően folyamatos csökkenést mutatott.




**49. ábra. OPA termelési kinetikája három különböző tenyésztési hőmérsékleten.**

*** p<0,05;** p<0,01; *** p<0,001**

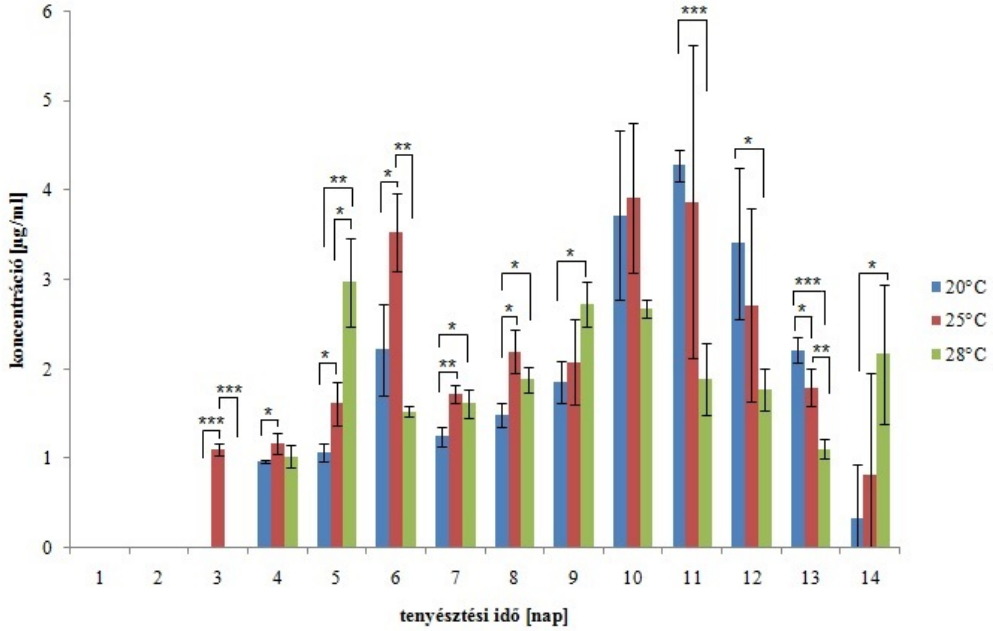
A tenyésztési hőmérséklet OPI termelési kinetikájára gyakorolt hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy a termelési maximumot 20 °C-on a tenyésztés 12. napján, 25 °C–on a 11. napján, míg 28 °C-on a 14. napján érte el (**50. ábra**). A 6-e-OPA kinetikájához hasonlóan, az alacsonyabb hőmérsékleteken, a termelési maximumot követően csökkenő tendenciát figyeltünk meg. A 28 °C-os tenyészetek esetében ez a maximum érték a tenyésztési időszak utolsó napján jelentkezett, így csökkenő OPI koncentrációt nem tapasztaltunk.




**50. ábra. OPI termelési kinetikája három különböző tenyésztési hőmérsékleten.**

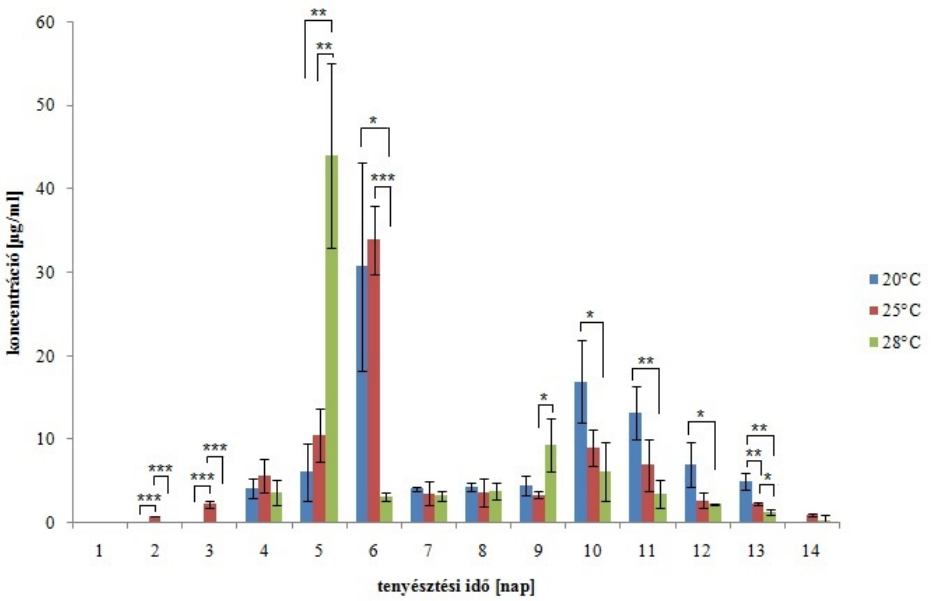
*** p<0,05;** p<0,01; *** p<0,001**

A tenyésztési hőmérséklet 3-a-OPA termelésére gyakorolt hatásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy az egyes tenyésztési hőmérsékletek között nincs jelentős eltérés (**51. ábra**). A 20 °C-on mért 3-a-OPA koncentrációk kis mértékben ugyan, de jobbnak bizonyultak a magasabb tenyésztési hőmérsékleteken mért értékeknél. A termelési maximum a 20 °C-, illetve 25 °C-os tenyészetek esetében az inkubációs időszak 11. napján jelentkezett. A 3-a-OPA termelési kinetikáját vizsgálva érdekes módon két maximumos értéket lehetett megfigyelni, 28 °C-on az 5. és 9-10. napokon, míg 20 °C- és 25 °C-on a 6. és 10-11. napokon.




**51. ábra. 3-a-OPA termelési kinetikája három különböző tenyésztési hőmérsékleten.**
*** p<0,05;** p<0,01; *** p<0,001**

A 3-a-6-e-OPA 25 °C-on már a tenyésztési időszak második napján megjelent a fermentlében, míg a másik két vizsgált hőmérsékleten csak egy nappal később mutattuk ki (**52. ábra**). Maximum értékét 28 °C-on az 5. napon érte el, majd ezt követően a fermentléből kimutatható koncentrációja drasztikusan csökkent és három nap stagnálás után, a tenyésztési időszak kilencedik napján kis mértékben megemelkedett, végül egy lecsengő fázisba lépve az inkubációs időszak végéig folyamatosan csökkent. Az alacsonyabb tenyésztési hőmérsékleteken is hasonló tendenciát lehetett felfedezni, azzal a különbséggel, hogy mind a 3-a-6-e-OPA termelési maximumát, mind pedig a második maximumot és az azt követő csökkenő szakaszt egy-egy nappal később detektáltuk.




**52. ábra. 3-a-6-e-OPA termelési kinetikája három különböző tenyésztési hőmérsékleten.**
*** p<0,05;** p<0,01; *** p<0,001**

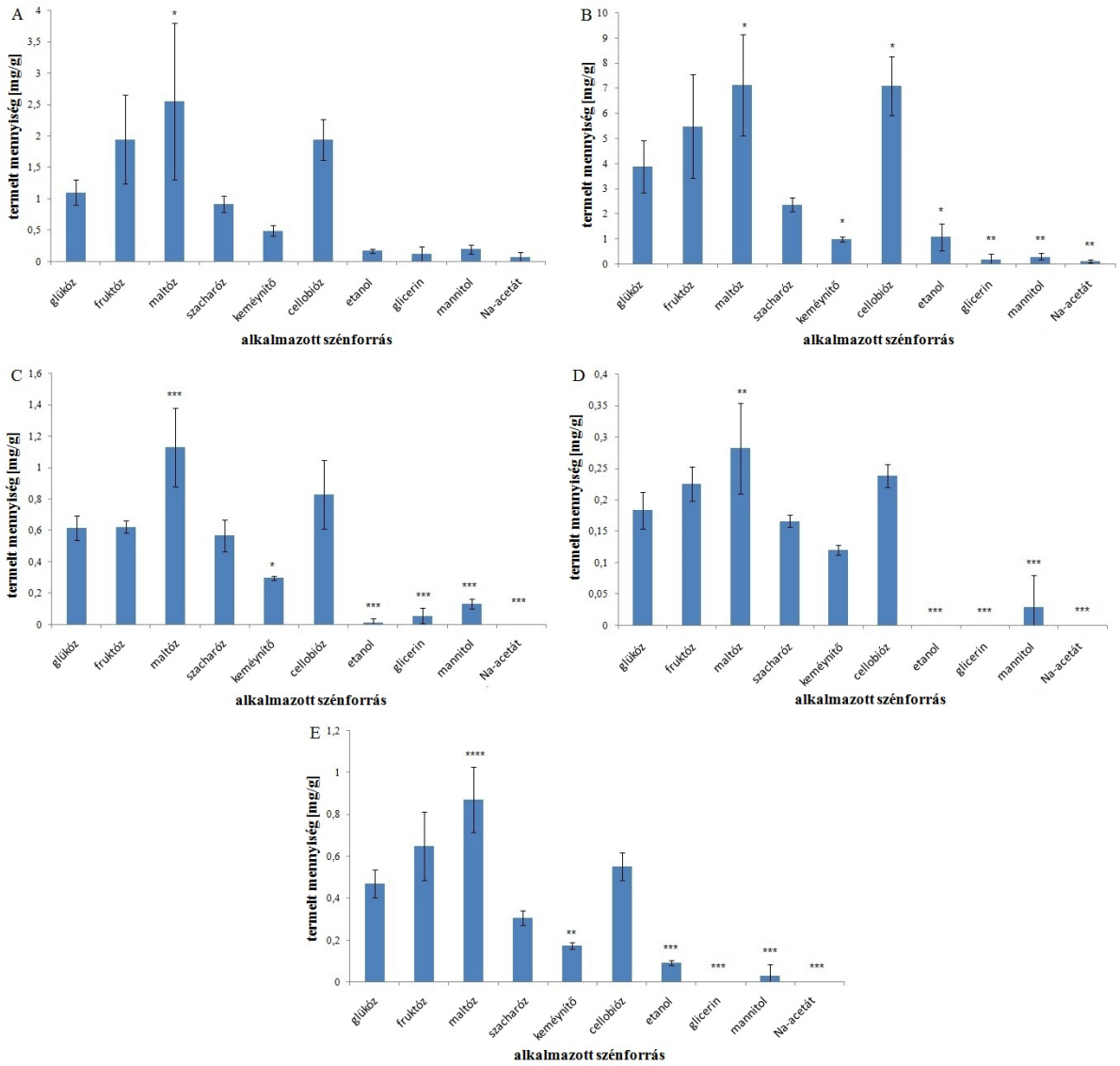
### *6.7.4 Szénforrás optimalizálása*

A *B. oryzae* SZMC 24163 jelű törzs optimális tenyésztési körülményeinek vizsgálata során igyekeztünk megállapítani, hogy a különböző szénforrások milyen hatással bírnak az egyes ophiobolin analógok termelésére. A fentieknek megfelelően a lombikok leoltását 2x10 végkoncentrációjú konídium szuszpenzióval valósítottuk meg egy 6 napos tenyésztési időszak során. A tenyésztési időszak végén a micéliumokat szűrtük, tömegállandóságig szárítottuk, majd analitikai mérleg segítségével meghatároztuk tömegüket (**17. táblázat**).

**17. táblázat. A különböző szénforrásokon tenyésztett *B. oryzae* SZMC 24163 szárazanyag tömegei.**

| *alkalmazott szénforrás* | *szárazanyag tömeg (mg)* |
|---|---|
| **cellobióz** | 413,0 ± 25,1 |
| **etanol** | 501,3 ± 20,1 |
| **fruktóz** | 425,2 ± 48,4 |
| **glicerin** | 407,8 ± 62,5 |
| **glükóz** | 397,3 ± 33,7 |
| **keményítő** | 427,3 ± 23,1 |
| **maltóz** | 440,6 ± 48,6 |
| **mannóz** | 473,8 ± 57,9 |
| **nátrium-acetát-trihidrát** | 581,5 ± 65,8 |
| **szacharóz** | 399,6 ± 14,3 |

A vizsgálatba bevont szénforrások (glükóz, fruktóz, maltóz, szacharóz, keményítő, cellobióz, etanol, glicerin, mannitol és Na-acetát) esetében az egyes ophiobolin származékok hasonló eredményeket mutattak. A legnagyobb mennyiséget minden esetben a maltóz hozzáadásával módosított tápoldat esetben sikerült detektálni, azonban a cellobiózzal módosított tápoldatban is nagymértékben megnőtt az egyes származékok termelése. Glükóz, illetve fruktóz alkalmazása esetén szintén jelentős ophiobolintermelést tapasztaltunk, azonban ezek az értékek elmaradnak a maltózzal módosított fermentléből kimutatható ophiobolin mennyiségektől (**53. ábra**).




**53. ábra. Különböző szénforrások hatása az egyes ophiobolinok termelésére. 6-e-OPA (A), OPA (B), OPI (C), 3-a-OPA (D), 3-a-6-e-OPA (E).**

*** p<0,05;** p<0,01; *** p<0,001**

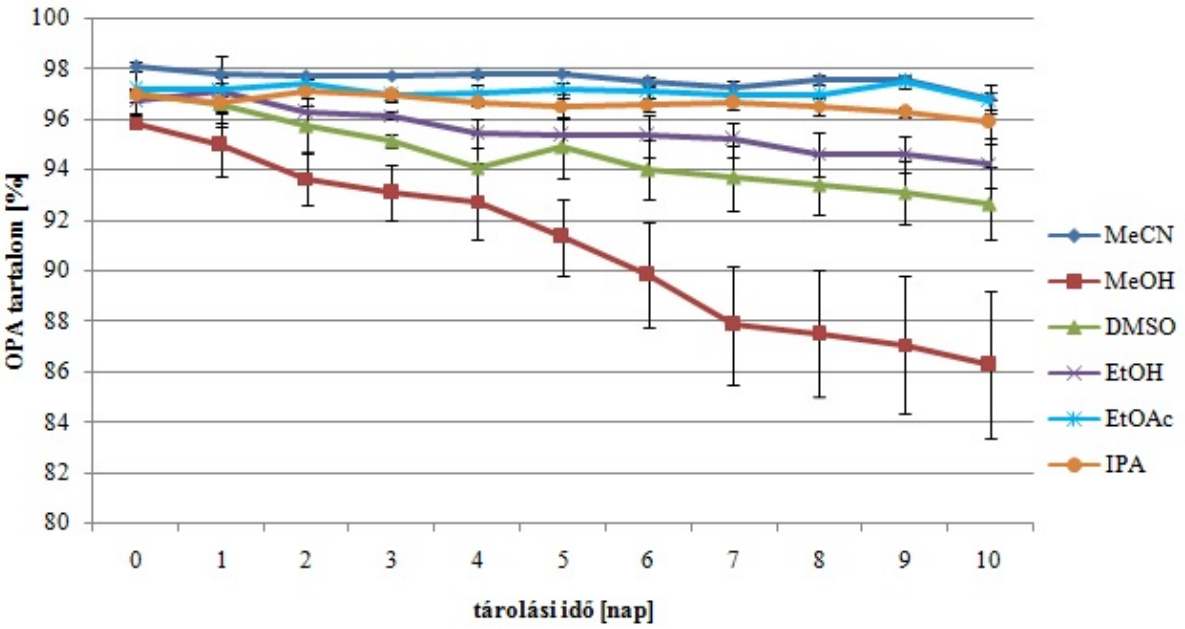
Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az ophiobolinok termeltetésére legalkalmasabb tápoldat a PMB (potato maltose broth – 50% burgonyakivonat, 50% desztillált víz és 2% maltóz), míg optimális tenyésztési hőmérsékletnek a 28 °C tekinthető.

## 6.8 Az OPA stabilitása szerves oldószerekben

A különböző, potenciálisan bioaktív vegyületek hatásainak vizsgálatához kiemelten fontos ezen vegyületek stabilitásának, valamint bomlástermékeinek ismerete. Napjainkig igen kevés irodalmi adat áll rendelkezésre az ophiobolinok stabilitásáról (Yun és mtsi. 1988, Bury és mtsi. 2013a), így célunk volt a legismertebb ophiobolin származék, az OPA stabilitásának vizsgálata különböző szerves oldószerekben, három eltérő hőmérsékleten.

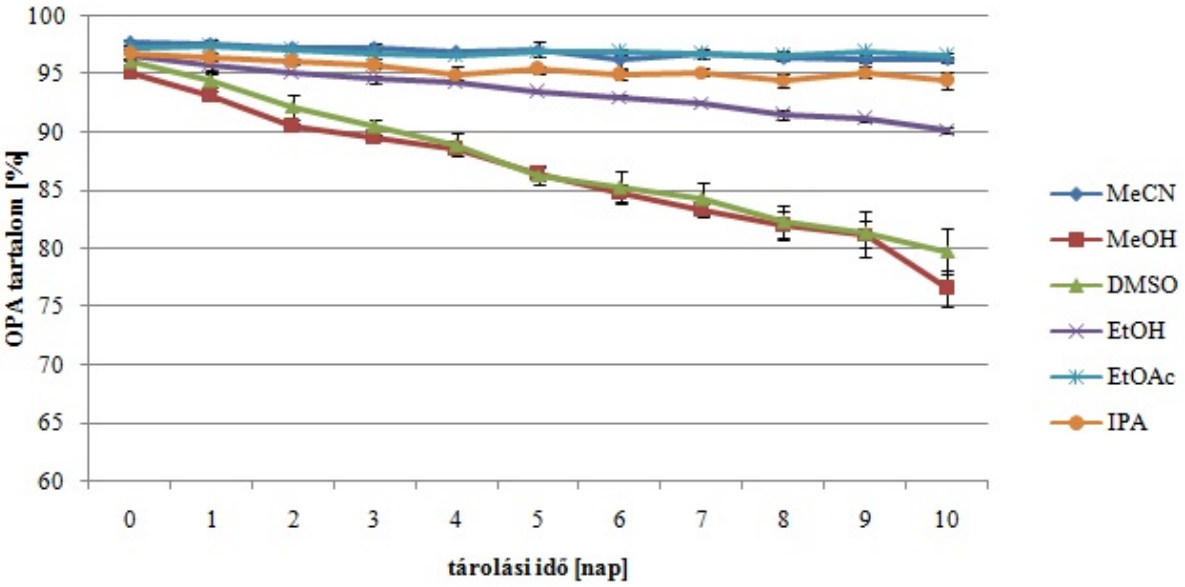
Munkánk során a *B. oryzae* CBS 310. 64 jelű törzséből általunk tisztított OPA-t használtuk acetonitril, metanol, etanol, etil-acetát, izopropil-alkohol, valamint dimetil-szulfoxid szerves oldószerekben 100 µg/ml koncentrációban. 50-50 µg OPA-t oldottunk be 500-500 µl oldószerbe három párhuzamosban, majd a mintákat három különböző hőmérsékleten (-20 °C, 4 °C, 25 °C) tároltuk. Az OPA esetleges bomlásának vizsgálatát a 10 napos inkubációs időszak alatt napi mérésekkel valósítottuk meg analitikai HPLC rendszeren. Az eredmények értékelését az egyes mintakomponensek százalékos előfordulásának ábrázolásával végeztük el.

MeCN-ben, EtOAc-ban, valamint IPA-ban az OPA nem mutat számottevő bomlást -20 °C-on. A másik három szerves oldószer esetében a bomlás mértéke már jelentősebbnek mondható, MeOH-ban a kezdeti állapothoz képest a mintában jelen lévő OPA mennyisége 10%-kal csökkent (**54. ábra**).




**54. ábra. Tisztított OPA bomlási kinetikája -20 °C-on hat különböző szerves oldószerben.**

A 4 °C-on tárolt minták esetében a bomlási tendenciák már jóval szembetűnőbbek (**55. ábra**). MeCN és EtOAc szerves oldószerekben az OPA stabil maradt a vizsgálati időszak alatt, azonban IPA-ban kismértékű bomlást lehetett megfigyelni. EtOH-ban a bomlás mértéke már szembetűnőnek nevezhető a -20 °C-on mért adatokkal összehasonlítva. A minták OPA tartalma mintegy 6%-os csökkenést mutatott. A legnagyobb változást MeOH és DMSO esetében lehetett megfigyelni, a bomlás mértéke mindkét oldószer esetében hasonló görbe mentén változott és mintegy 15-20%-os koncentráció csökkenést eredményezett a vizsgálati időszak végére.

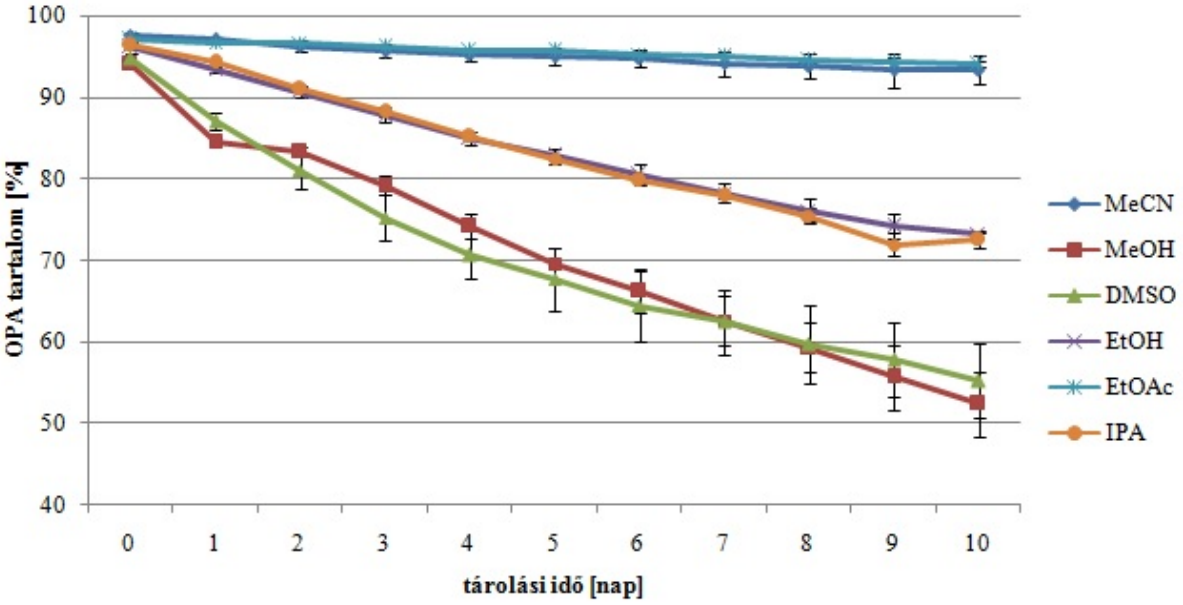



**55. ábra. Tisztított OPA bomlási kinetikája 4 °C-on hat különböző szerves oldószerben.**

Az OPA bomlásának vizsgálatakor 25 °C-on történő tárolásakor jól megfigyelhető, hogy a vizsgált vegyület csak minimálisan degradálódott MeCN és EtOAc szerves oldószerekben (**56. ábra**). Az alacsonyabb tárolási hőmérsékletekkel ellentétben 25 °C-on az IPA- és EtOH-ban oldott OPA is jelentős bomláson esett át. A kezdeti 96%-os tisztaságú oldat a 10. napon már csak 72%-os volt, továbbá a bomlás mértéke mindkét oldószerben hasonlónak mutatkozott. A legintenzívebb bomlást MeOH-ban és DMSO-ban lehetett megfigyelni. DMSO esetében már a negyedik napon csupán 70%-os volt az OPA oldat tisztasága, míg ez az érték MeOH-ban egy nappal később jelentkezett. Bár a bomlás mértéke hasonló volt mind MeOH-ban, mind pedig DMSO-ban, azonban a 7. napig ez utóbbiban valamivel intenzívebben zajlott le. A 7. napot követően a bomlás intenzitása megfordult és a

MeOH-s oldatban mért OPA tisztasága mutatott kisebb értékeket. A tárolási időszak utolsó napjára a DMSO-ban és MeOH-ban oldott OPA tisztasága rendre 55% és 52%-nak bizonyult.

Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy az OPA oldatban történő tárolására leginkább alkalmas szerves oldószer a MeCN, valamint az EtOAc. Mivel az analitikai mérések során alkalmazott eluens szerves összetevője MeCN, így a célszerű ebben az oldószerben tárolni az OPA-t. Az OPA bomlási kinetikái alapján -20 °C tekinthető ideális tárolási hőmérsékletnek.



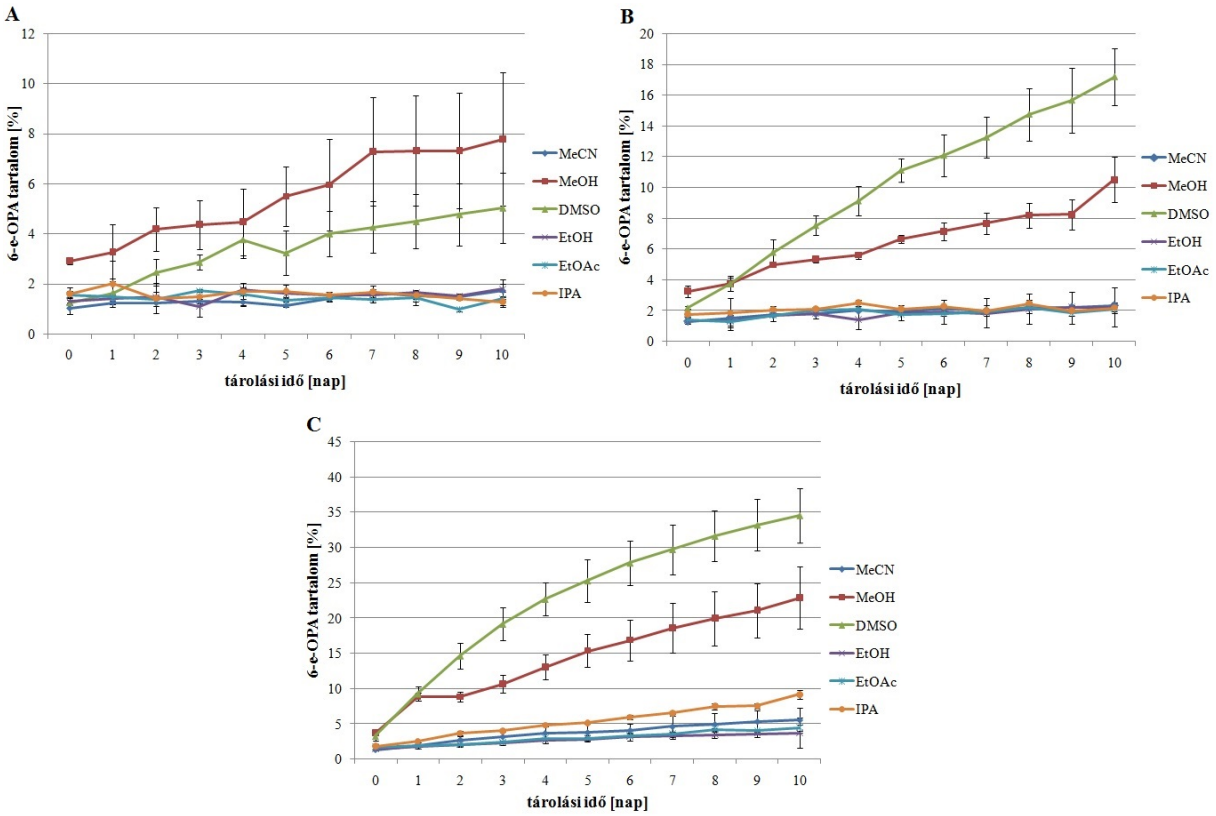

**56. ábra. Tisztított OPA bomlási kinetikája 25 °C-on hat különböző szerves oldószerben.**

Bár az általunk alkalmazott tárolási körülmények több pontban is eltérnek az irodalomban találhatóaktól (Yun és mtsi. 1988), azonban a -20 °C-on, MeOH-ban történő tárolás során tapasztalt bomlás mértéke hasonlónak bizonyult a korábbi vizsgálatokban leírtakhoz. Magasabb hőmérsékleteken az általunk mért adatok valamivel intenzívebb bomlási folyamatra engednek következtetni.

Irodalmi adatokkal összevetve eredményeinket azt tapasztaltuk, hogy az OPA MEM tápoldatban 37 °C-os tárolási hőmérsékleten 1 hét inkubációt követően 30%-os csökkenést mutatott (Bury és mtsi. 2013a). Ez közel azonos bomlási ráta, mint amit 25 °C-on, MeOH-ban történő tárolás során tapasztaltunk. TBY-2 tápközegben az OPA bomlása az általunk tapasztaltaknál is nagyobb mértéket öltött, mindössze 4 napi tárolást követően 40%-os bomlás volt megfigyelhető.

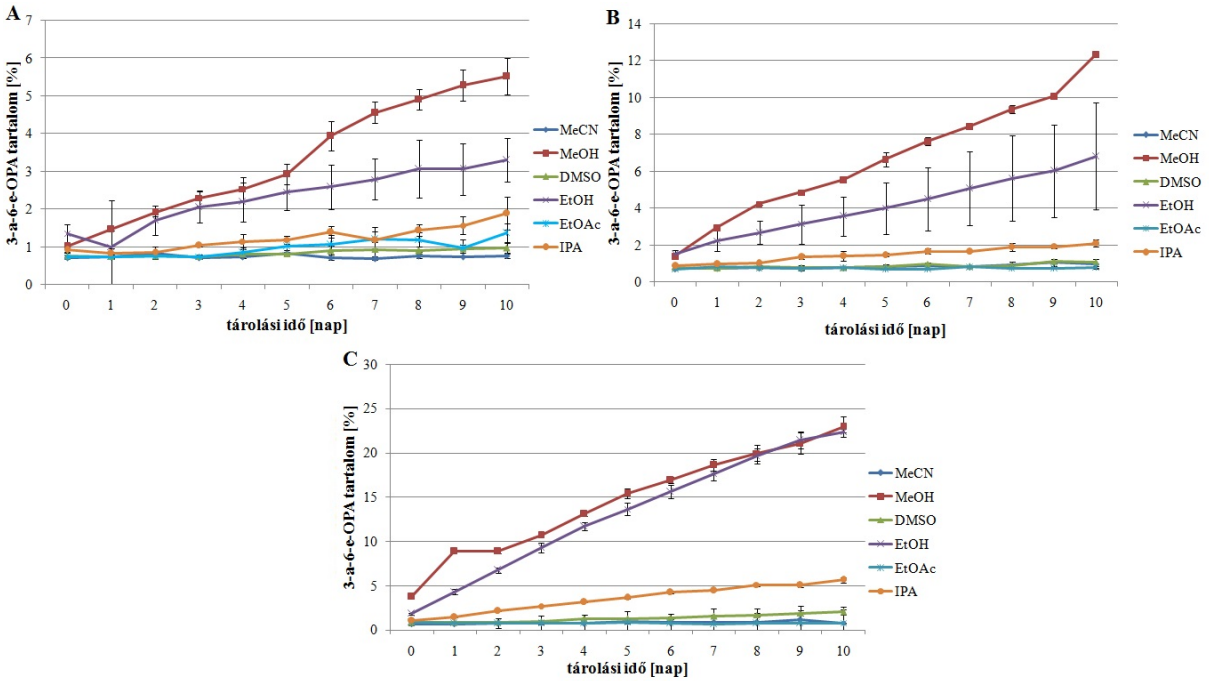
A bomlási vizsgálatok során nem csupán arra kerestük a választ, hogy milyen oldószerben és milyen hőmérsékleten tárolható biztonsággal az OPA, hanem arra is, hogy az esetleges bomlási folyamatok során milyen bomlástermékek keletkeznek. Mindegyik vizsgált szerves oldószer esetében a 6-e-OPA és a 3-a-6-e-OPA bizonyultak a két fő bomlásterméknek.

A 6-e-OPA keletkezését -20 °C-on, valamint 4 °C-on MeOH és DMSO jelenlétében figyeltük meg, illetve 25 °C-on már a többi vizsgált szerves oldószer alkalmazása esetén is tapasztalható volt ezen ophiobolin származék mennyiségi növekedése (**57. ábra**). Figyelemre méltó módon -20 °C-on MeOH mellett nagyobb mértéken keletkezett 6-e-OPA, mint DMSO jelenlétében, míg magasabb tárolási hőmérsékleteken ez az arány megfordult, és az első nap után mind 4 °C-on, mind 25 °C-on a DMSO oldat 6-e-OPA koncentrációja bizonyult magasabbnak a MeOH oldatban mért értékeknél. A legnagyobb mért 6-e-OPA mennyiséget a vizsgálat utolsó napján 25 °C-on sikerült detektálni, mely ekkorra már elérte a 35%-os arányt, míg MeOH esetében ez az érték megközelítőleg 23%-nak bizonyult.



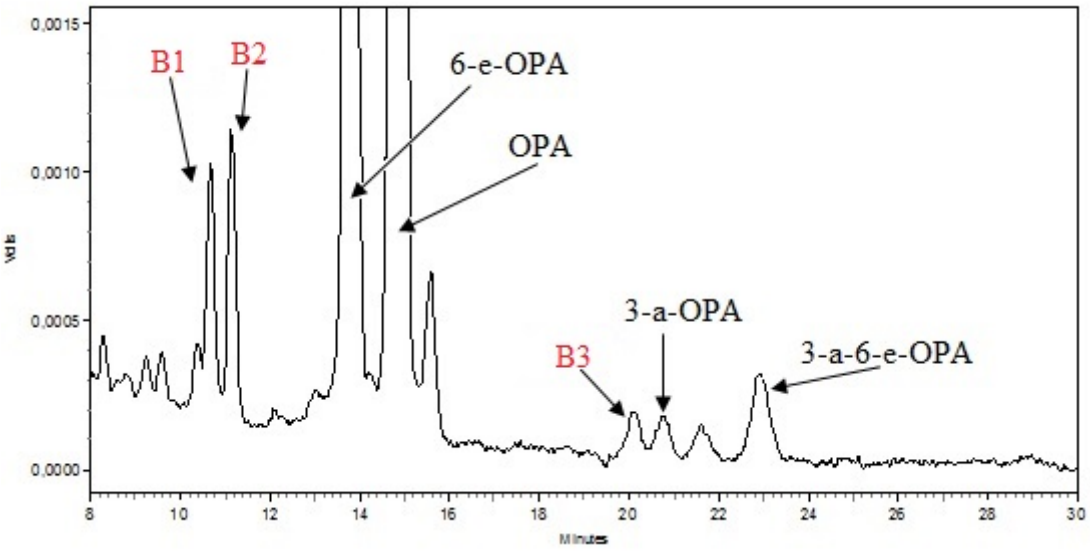

**57. ábra. Az OPA bomlása során keletkező 6-e-OPA mennyiségének változása 3 tárolási hőmérsékleten (A: -20 °C; B: 4 °C; C: 25 °C) 6 különböző szerves oldószerben.**

A 3-a-6-e-OPA keletkezése mindhárom vizsgált hőmérsékleten megfigyelhető, de a 6-e-OPA-val szemben ez a vegyület elsősorban MeOH-ban és EtOH-ban képződik az OPA bomlása során (**58. ábra**). Érdekes tény, hogy az OPA MEM illetve TBY-2 tápközegben vizsgált bomlása során szintén ezt az ophiobolin származékot azonosították (Bury és mtsi. 2013a).



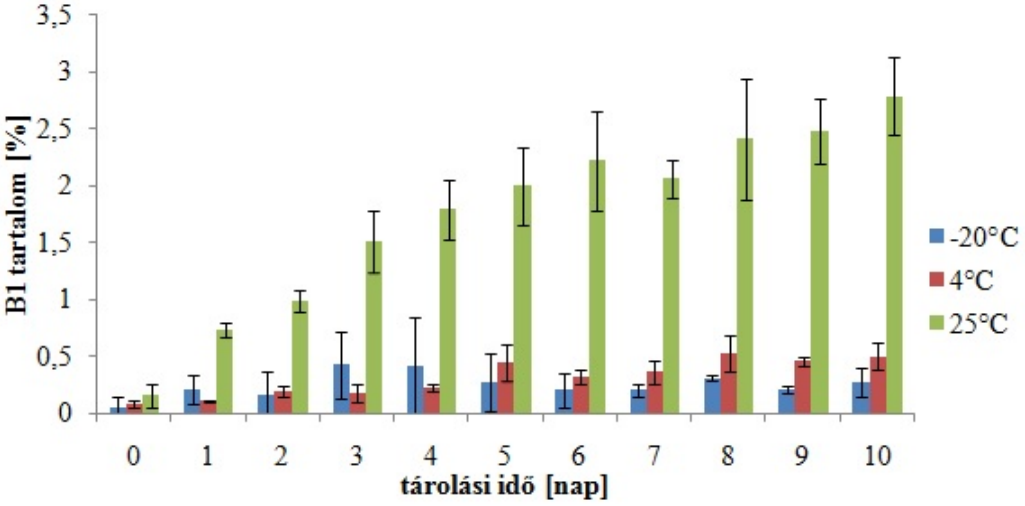

**58. ábra. Az OPA bomlása során keletkező 3-a-6-e-OPA mennyiségének változása 3 tárolási hőmérsékleten (A: -20 °C; B: 4 °C; C: 25 °C) 6 különböző szerves oldószerben.**

DMSO-ban három ismeretlen bomlástermék megjelenését lehetett megfigyelni, ezek rendre B1, B2 és B3 névvel lettek ellátva elúciós sorrendjüknek megfelelően ($RT_{B1}$ = 10,2 perc; $RT_{B2}$ = 11,1 perc; $RT_{B3}$ = 20,1 perc) (**59. ábra**).




**59. ábra. Az OPA bomlástermékei DMSO-ban.**

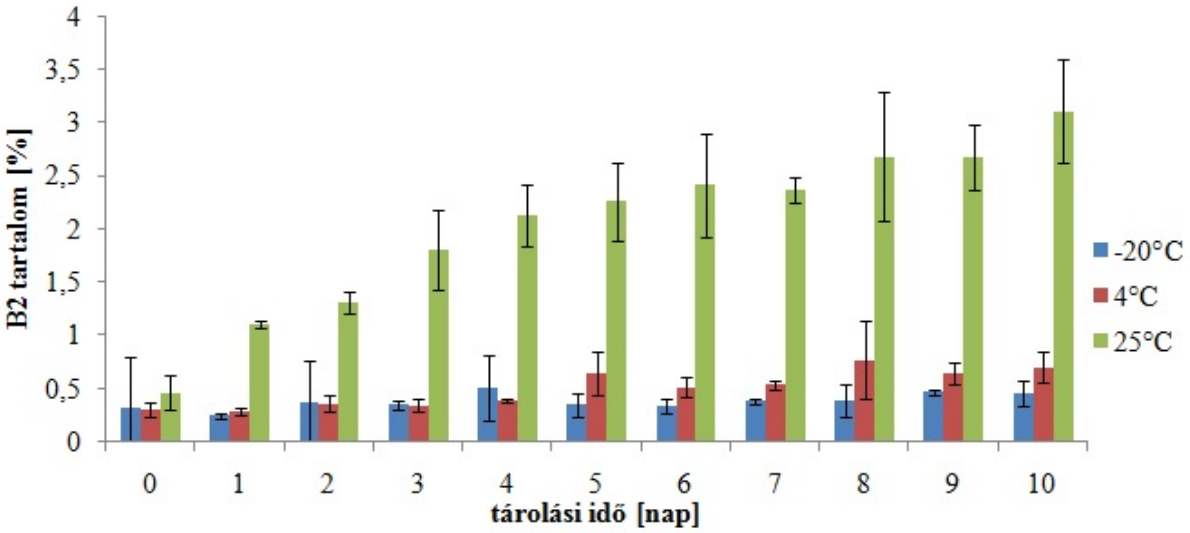
A B1 mennyiségének növekedése már a kísérlet első napjától megfigyelhető, elsősorban 25 °C-on (**60. ábra**). Az alacsonyabb tárolási hőmérsékleteken nem volt tapasztalható számottevő változás ezen bomlástermék mennyiségében. 25 °C-on történő tároláskor a B1 jelű vegyület aránya több mint tizennyolcszorosára (0,15%-ról 2,78%-ra) nőtt a tárolási időszak végére.




**60. ábra. A B1 jelű bomlástermék mennyiségének változása az OPA DMSO-ban megfigyelt bomlása során.**

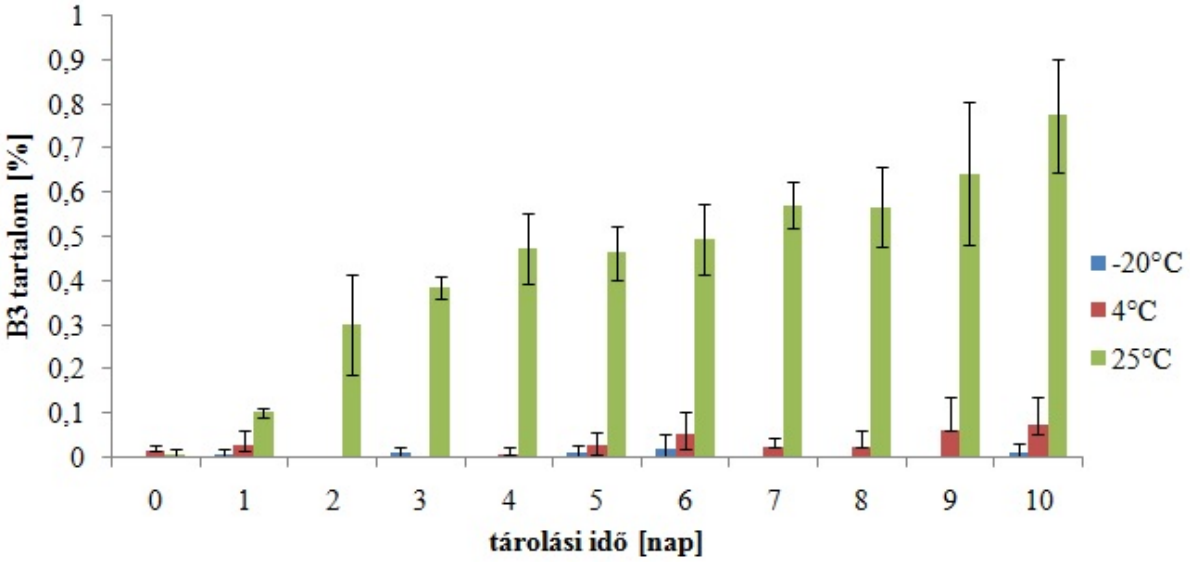
A B2 jelű bomlástermék keletkezésének üteme a kísérleti időszakban hasonló eredményt mutatott, mint a B1 (**61. ábra**). A -20 °C-on, valamint 4 °C-on tárolt minták

esetében nem tapasztaltunk jelentős változást a mintakomponens mennyiségében, azonban a 25 °C-os tárolási hőmérsékleten mért adatok alapján szembetűnő növekedés volt megfigyelhető. A B2 bomlástermék aránya közel hétszeresére (0,46%-ról 3,11%-ra) nőtt a tárolási időszak 10. napjára.



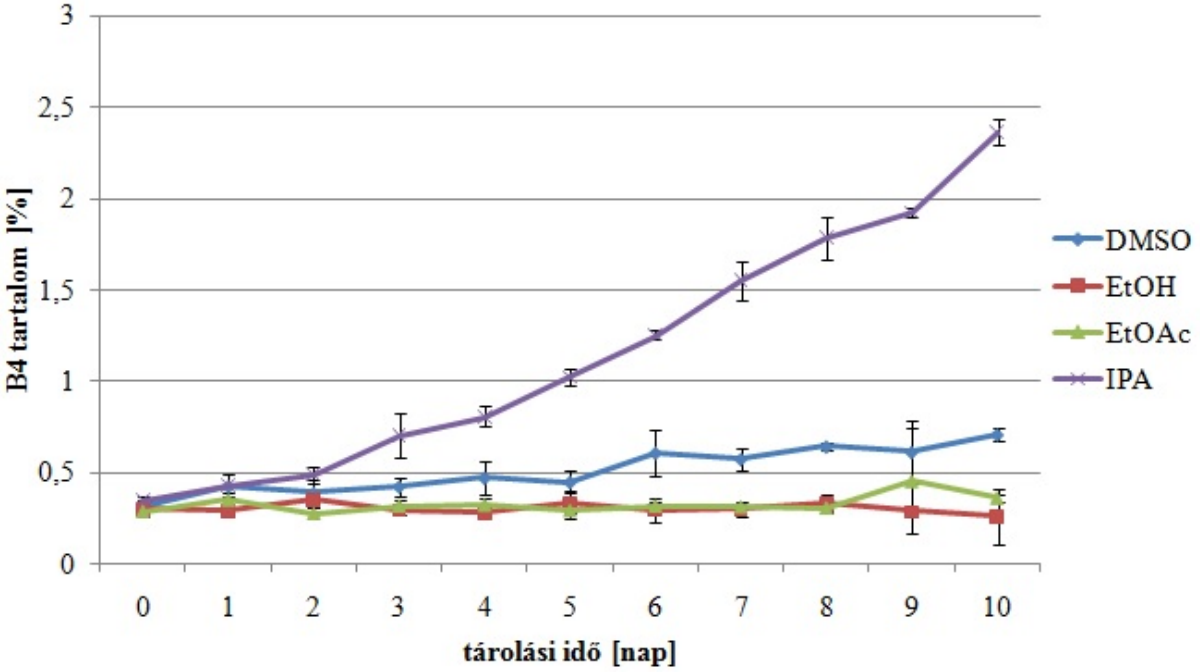

**61. ábra. A B2 jelű bomlástermék mennyiségének változása az OPA DMSO-ban megfigyelt bomlása során.**

Szintén jelentős mennyiségi növekedést lehetett megfigyelni B3 esetében is (**62. ábra**). Az előzőekhez hasonlóan alacsony hőmérsékleteken nem produkált számottevő mennyiségi változást, azonban 25 °C-on a B3 keletkezése jelentős mértékben felgyorsult és a tárolási időszak végére aránya megközelítette a 0,8%-ot.



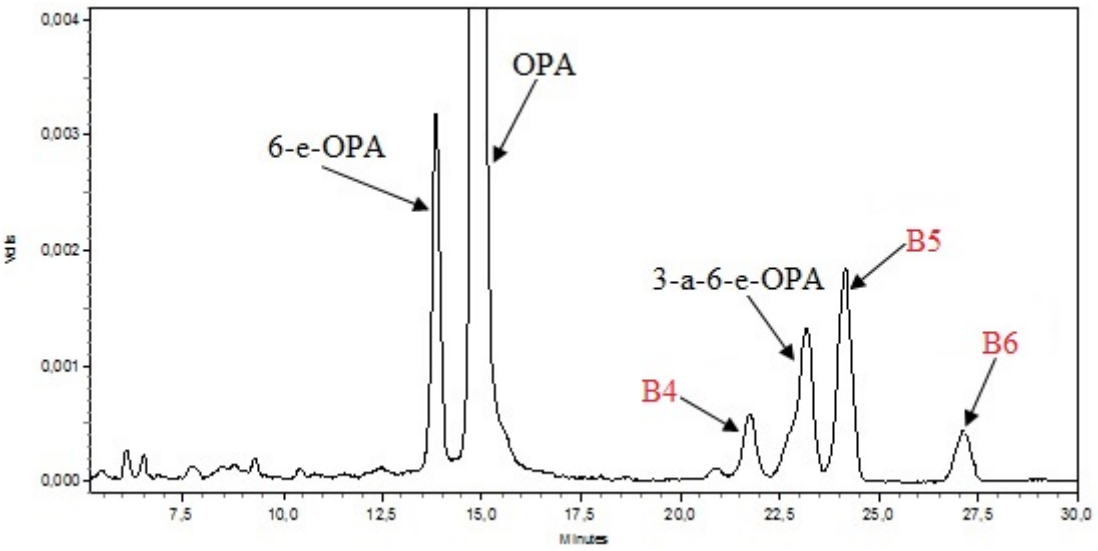

**62. ábra. A B3 jelű bomlástermék mennyiségének növekedése az OPA DMSO-ban megfigyelt bomlása során.**

Egy másik bomlástermék, a B4 ($RT_{B4}$ = 21,7 perc) vizsgálata során megállapítottuk, hogy elsősorban IPA jelenlétében keletkezik magasabb tárolási hőmérsékleten (**63. ábra**). A 10. napra aránya megközelítette a 2,5%-ot. DMSO jelenlétében szintén 25 °C-on csupán enyhe növekedést lehetett tapasztalni.

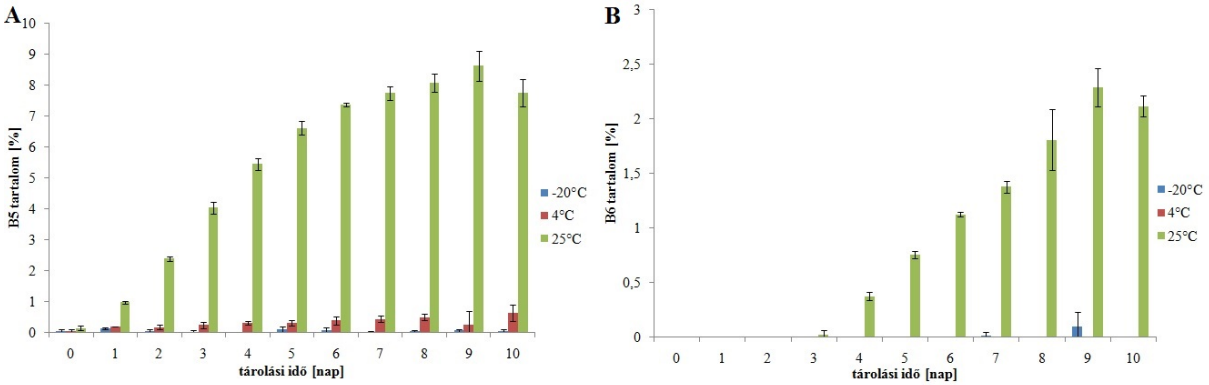



**63. ábra. A B4 jelű bomlástermék keletkezésének üteme 25 °C-on első sorban IPA jelenlétében kiemelkedő.**

További két, eddig azonosítatlan bomlástermék megjelenését lehetett detektálni IPA jelenlétében, ezek rendre B5 és B6 nevet kapták ($RT_{B5}$ = 24,1 perc; $RT_{B6}$ = 27,1 perc) (**64. ábra**). Mindkét bomlástermék esetében megfigyelhető, hogy -20 °C-on, valamint 4 °C-on nem mutatnak számottevő mennyiségi növekedést. Ezen bomlástermékek keletkezése is csak 25 °C-on figyelhető meg. További hasonlóságként lehet említeni, hogy mind B5, mind pedig B6 esetében a tárolási időszak utolsó napján mennyiségük csökkenésnek indult. B5 25 °C-os tárolási hőmérsékleten a 9. napon mutatott maximum értéket, ekkor aránya megközelítette a 9%-ot, míg a B6 jelű vegyület szintén ezen a napon érte el maximumát, azonban ennek aránya 2,3% volt (**65. ábra**).




**64. ábra. Az IPA jelenlétében keletkezett bomlástermékek.**




**65. ábra. B5 (A) és B6 (B) jelű bomlástermékek keletkezése.**

Az OPA szerves oldószerekben történő bomlásvizsgálatának eredményeként megállapítottuk, hogy a legnagyobb stabilitást MeCN-ben és EtOAc-ban mutatta -20 °C-on. Különböző alkoholokban (MeOH, EtOH, IPA) történő tárolása bomlást eredményez, melynek mértéke a tárolási hőmérséklet emelkedésével nő. A legintenzívebb bomlási folyamatot MeOH-ban és DMSO-ban tapasztaltuk. Számos tesztrendszer, mely biológiai aktivitás mérésére szolgál, előszeretettel alkalmazza a DMSO-t, mint szerves oldószert (Emter és mtsi. 2015, Houdkova és mtsi. 2017). és bár ezen bioteszteken során a DMSO-ban oldott tesztvegyületet hígítják, eredményeink szerint számolni kell azon eshetőséggel, hogy a DMSO törzsoldat bomlásnak indulhat még alacsony hőmérsékleten is.

Megállapítottuk továbbá, hogy a várható bomlástermékek függnek az alkalmazott szerves oldószer minőségétől. DMSO-ban a fő bomlástermékek (6-e-OPA, 3-a-6-e-OPA) mellett három másik bomlástermék (B1, B2, B3) is megjelenik, melyek mennyiségi aránya

együttesen közel 7%-nak bizonyult. IPA-t használva szerves oldószerként két újabb bomlástermék (B5 és B6) jelent meg a fő bomlástermékek mellett, azonban a DMSO-ra jellemző vegyületek nem keletkeztek. Ezen vegyületek együttes aránya a vizsgálati időszak végére elérte a 10%-ot.

## 6.9 Ophiobolinok biológiai aktivitásának vizsgálata

### *6.9.1 Az ophiobolinok hímivarsejtek mozgékonyságára kifejtett hatása*

A vadkan hímivarsejtek egyedi tulajdonságai elsőrangú modellé teszik mitokondriális toxinok vizsgálatára, mivel ezen biológiai egységek érzéketlenek a fehérjék és citoplazmatikus nukleinsavak regulációjára és szintézisére ható anyagokkal szemben, valamint a szomatikus sejtekben feltárt összes szignalizációs rendszer bennük is megtalálható (Hoornstra és mtsi. 2003). Továbbá fiziológiai jellemzőik, beleértve mozgékonyságukat is, a membránpotenciálok és ionáramlások által szabályozott. Ezáltal az ivarsejt mozgékonyságában bekövetkezett változás, ellentétben más sejtvonalakkal alkalmassá teszi őket arra, hogy akár szubletális dózisban is detektálhatóak legyenek olyan anyagok, melyek a mitokondriális membrán depolarizációjáért felelnek (Hoornstra és mtsi. 2003). A hímivarsejtek mozgékonyságát a kezelés utáni 30 perc, illetve 24 óra szobahőmérsékleten történő inkubációs időtartam elteltével vizsgáltuk egy korábban közzétett módszer alapján (Andersson és mtsi. 1997, Andersson és mtsi. 2010). Az OPA 24 órás expozícióban tízszer kisebb koncentrációban gátolta a spermiumok mozgását, mint a 30 perces expozíciós idejű kísérletekben. A rövid és hosszú expozíciójú tesztek során végpontokként ($EC_{50}$) rendre ≤2,5 µg/ml és 250 ng/ml koncentrációkat határoztunk meg.

### *6.9.2 Az ophiobolinok hatása a plazmamembrán-polarizációjára*

Az OPA spermiumokra gyakorolt hatását fiziológiás körülmények között (úszás 37 °C-on) a mozgékony hímivarsejtek plazmamembrán-degradációjának vizsgálatával teszteltük PI festéssel. A plazmamembrán integritásának elvesztését a sérült sejtek sejtmagjának vörös festődése jelezte. A mért $EC_{50}$ érték 800 ng/ml és 1600 ng/ml közé esett (életképesség 38% - 73%, **18. táblázat**). A kapott eredmények azt mutatták, hogy az OPA fiziológiás körülmények

között (mozgékonyság, 37 °C-on) már két óra elteltével letálisnak bizonyult a hímivarsejtekkel szemben 2000 ng/ml koncentráció alatt.

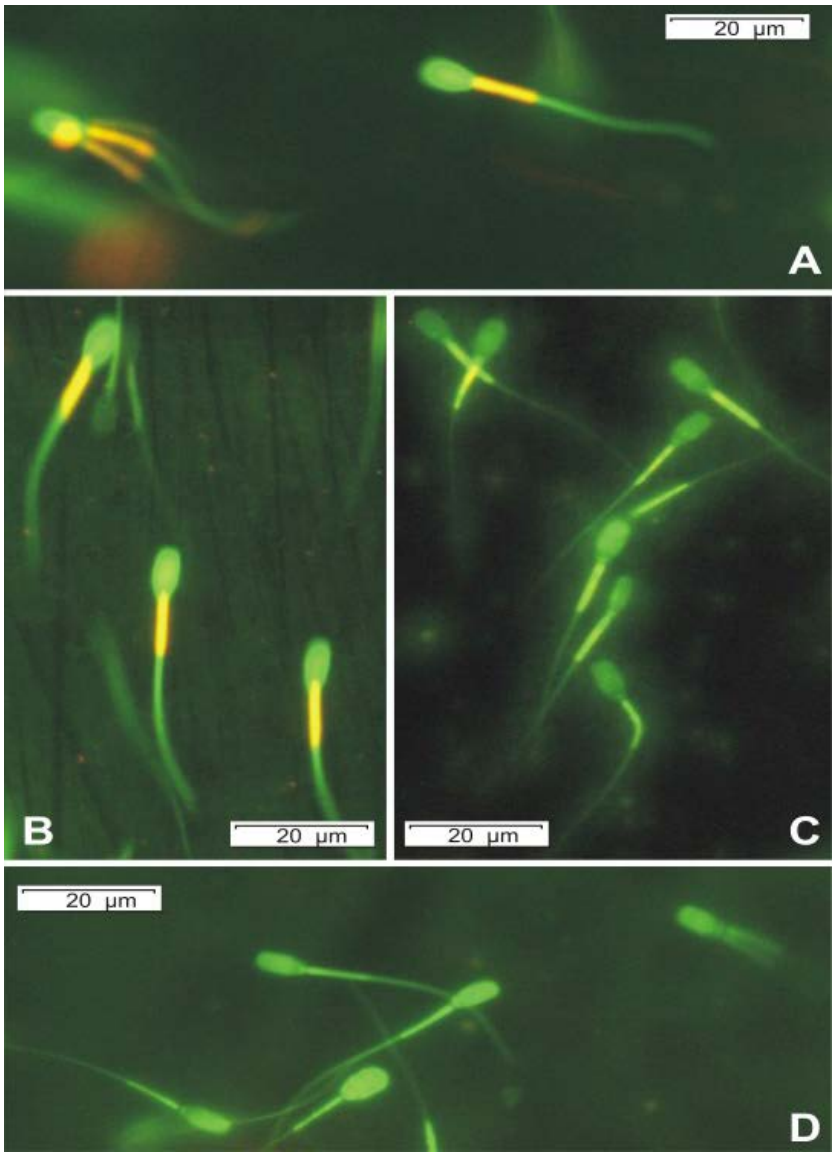
Az OPA plazmamembrán permeabilitására gyakorolt hatásának megerősítésére PI és CAM festést alkalmaztunk 24 órás inkubációval szobahőmérsékleten. Ebben az esetben az $EC_{50}$ érték 1,6 µg/ml-nek adódott.

### *6.9.3 Az ophiobolinok hatása a mitokondriummembrán polarizációjára*

A membránpermeábilis JC-1 széles körben használt festék a mitokondriumok tanulmányozására apoptotikus kísérletekben. Potenciálfüggő feldúsulását zöld-vörös átmenetű fluoreszcencia emisszió változás jelzi (De Proost és mtsi. 2008). Ezért $\Delta\Psi_m$ csökkenése a narancs fluoreszcencia csökkenésével megfigyelhető (Hoornstra és mtsi. 2003). Esetünkben 2 perc festés JC-1 festékkel 37 °C-on elegendőnek bizonyult a mitokondrium narancs és a plazmamembrán zöld színű festődéséhez. Ezen rövid idejű festési eljárást kísérletesen optimalizáltuk, hogy a lehető legjobban reprodukálható különbségeket érjük el a kezelt és kezeletlen hímivarsejtek között. Két perc inkubáció után az OPA teljesen depolarizálta a spermiumok mitokondriumát 2,5 µg/ml koncentrációban, azonban a kezelt sejtek már 500 ng/ml koncentráció esetén 50%-os fluoreszcencia csökkenést mutattak. A **66. ábra** szemlélteti az OPA-val kezelt hímivarsejtek mitokondriális membránpotenciál változását a kezelésekben alkalmazott koncentrációk hatására. A kontroll minta (csak festék) esetében a mitokondriális membrán a kontroll spermium középső részén élénk narancssárga színnel világít (**66. ábra-A**), míg a 125 ng/ml koncentrációjú OPA a kezeletlen kontroll mintához képest gyakorlatilag minimális eltérést okoz (**66. ábra-B**). Az 500 ng/ml koncentrációjú OPA hatására megközelítőleg 50%-os fluoreszcenciacsökkenést figyelhetünk meg a mitokondriumokban (**66. ábra-C**), majd végül a hímivarsejtek középső részének minden mitokondriuma teljes mértékben depolarizálódott 1,25 µg/ml OPA hatására és a spermiumok csak zöld fluoreszcenciát mutatnak **(66. ábra-D**).

A 6-e-OPA vizsgálata során megállapítottuk, hogy 2,5 µg/ml koncentrációban nem volt teljes a kezelt spermiumok mitokondriumának depolarizációja, megközelítőleg 80%-os fluoreszcenciacsökkenést lehetett tapasztalni, míg 1,25 µg/ml koncentrációban ez az érték 50%-osnak bizonyult. A 3-a-OPA esetében nem tapasztaltunk teljes depolarizációt egyik vizsgált koncentrációban sem, azonban megállapítható, hogy a kezelt sejtek 2,5 µg/ml koncentrációban 50%-os fluoreszcencia csökkenést mutattak. Teljes depolarizációt a 3-a-6-e-

OPA esetén sem tapasztaltunk, a legnagyobb alkalmazott koncentrációban is mintegy 80%-os fluoreszcencia csökkenés volt megfigyelhető. OPI esetében a vizsgált koncentráció tartományban egyáltalán nem tapasztaltunk fluoreszcencia csökkenést.




**66. ábra. JC-1 festett hímivarsejtek epifluoreszcens felvételei 400x nagyításban, kontrol minta (A); 125 ng/ml koncentrációjú OPA (B); 500 ng/ml koncentrációjú OPA (C); 1,25 µg/ml OPA (D).**

A vadkan hímivarsejteknél tapasztaltakhoz hasonlóan, az OPA gátolta a mozgékonyságot és csökkentette az életképességet egér spermiumok esetében, mindezen hatások mellett a spermiumok kapacitációjának gátlását is megfigyelték (Zeng és mtsi. 2003). Az OPA a növények membránpermeabilitását is megváltoztatta, ide értve az ionáteresztés megváltozását (Tipton és mtsi. 1977), továbbá gátolta a sejtek protonkiáramlását, ami a plazmamembrán kálium áteresztőképességére gyakorolt hatásának eredménye volt (Cocucci

és mtsi. 1983). Bury és mtsi. (2013b) intracelluláris kalcium koncentrációemelkedést figyeltek meg OPA-kezelt GBM sejtekben, ami azzal magyarázható, hogy a toxin blokkolta a sejtmembrán, mitokondrium és ER BKCa csatornáit, ami megemelkedett intracelluláris $K^+$-koncentrációt eredményezett. Ennek következtében a homeosztázis fenntartása érdekében folytonosan emelkedő $Ca^{2+}$-koncentrációval reagált a sejt. Esetünkben feltételeztük, hogy GBM sejtekhez hasonlóan a mitokondriális membrán depolarizációs tesztekben alkalmazott magasabb OPA koncentráció az intracelluláris $Ca^{2+}$ szintre is hatással van a $\Delta\Psi m$ szétoszlatása révén, azonban a rövidebb inkubációs periódus miatt alacsonyabb hatékonysággal, ami valószínűleg egy általános hiperaktivitási hatásként szolgált egyes spermiumok esetében a már leírt különleges kalmodulin gátlás mellett.

A spermiumokat a membránpotenciálra érzékeny JC-1, az életképesség-indikátor CAM és PI festékekkel festve, a hímivarsejtek mozgását gátló toxinokat két csoportra oszthatjuk. Az OPA azon vegyületek közé sorolható, melyek a mitokondriumot depolarizálják, ám eközben a plazmamembrán intakt marad (acrebol, enniatin B). A másik csoportba azon csatornaképző vegyületek (alamethicin, trilonginok) taroznak, melyek szintén depolarizálják a mitokondriumot, de szétoszlatják a plazmamembrán permeabilitási gátat (**18. táblázat**).

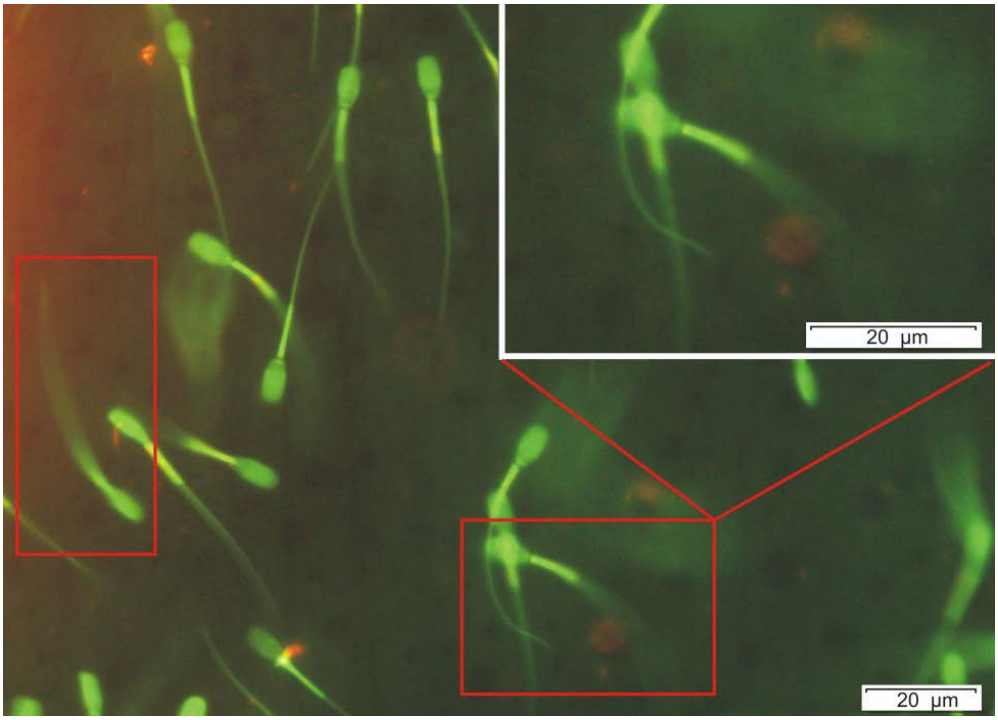
**18. táblázat. OPA és különböző mikotoxinok toxicitási végpontjainak összehasonlítása vadkan hímivarsejteken, illetve PK-15 (porcine kidney cell line) sejtvonalon.**

| | *Az egyes sejt szuszpenziók toxicitási végpontjai (µg/ml)* | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **vadkan hímivarsejt** | | | | **PK-15** | | |
| **vegyület** | **mozgékonyság gátlás (30 perc)** | **mozgékonyság gátlás (24 óra)** | **ΔΨm** | **PI permeabilitása statikus sejteken** | **PI permeabilitása motilis sejteken** | **citotoxicitás** | **Hiv.** |
| **OPA** | 2,5 | 0,25 | 0,5 | 1,6 | 1,6 | 0,1 | Bencsik és mtsi. 2014 |
| **Alamethicin** | 1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | ≤0,5 | 8 | Mikkola és mtsi. 2012 |
| **Trilongin BI-BIV** | na. | 0,5 | 0,5 | 0,5 | na. | 5 | Mikkola és mtsi. 2012 |
| **Acrebol** | 2 | 0,1 | 0,8 | >4 | na. | ≥10 | Andersson és mtsi. 2009 |
| **Enniatin B** | >10 | 5 | 5 | >50 | >20 | 60 | Tonshin és mtsi. 2010 |

A tisztított OPA sertés hímivarsejtekre gyakorolt toxikus hatását négy ismert toxinnal vetettük össze, melyek különböző szubcelluláris területet céloznak (**18. táblázat**). A **18.**

**táblázat**ban feltüntetett vegyületeket, a mitokondriumokat támadó enniatin B-t (Jestoi és mtsi. 2008), acrebolt (Andersson és mtsi. 2009), a kationcsatorna-képző alamethicint (Leitgeb és mtsi. 2007) és trilonginokat (Mikkola és mtsi. 2012) szintén fonalas gombák termelik. Továbbá az OPA toxicitási mintázata figyelemreméltó különbségeket mutat a már leírt ion carrier toxinokhoz (pl. cereulid, valinomycin), illetve a hímivarsejt feji részében látható hiperpolarizációt nem okozó acrebol és enniatin B toxinokhoz képest is (Hoornstra és mtsi. 2003, Andersson és mtsi. 2009).

Az OPA-val kezelt spermiumok számos esetben váratlanul felgyorsuló farokmozgást mutattak a mikroszkópos vizsgálatok alatt (**67. ábra**). Ez a mozgásbeli változás hasonló a megtermékenyítéskor fellépő jelenséghez, amikor is a spermium farki része a megszokott szimmetrikus mozgástól eltérően intenzív ostorozó mozgásba kezd, hogy sikeresen áthatolhasson a petesejt védőburkán (Zeng és mtsi. 2003). Ezen depolarizált membránnal rendelkező sejtek ostorcsapkodás-szerű farki mozgása arra enged következtetni, hogy a plazmamembránjuk intakt és elegendő metabolizmusból származó energiával rendelkeznek a csapkodó mozgások kivitelezéséhez. Ebből arra következtethetünk, hogy a kezelt sejtek továbbra is termelnek ATP-t és NADH-t a citoplazmában, ami eltér a kation csatornaképző alamethicintől, ami az OPA-val azonos koncentrációban gátat szab a hímivarsejtek mozgásának, ATP és NADH termelésének és roncsolja a plazmamembránjuk integritását (Andersson és mtsi. 2009).

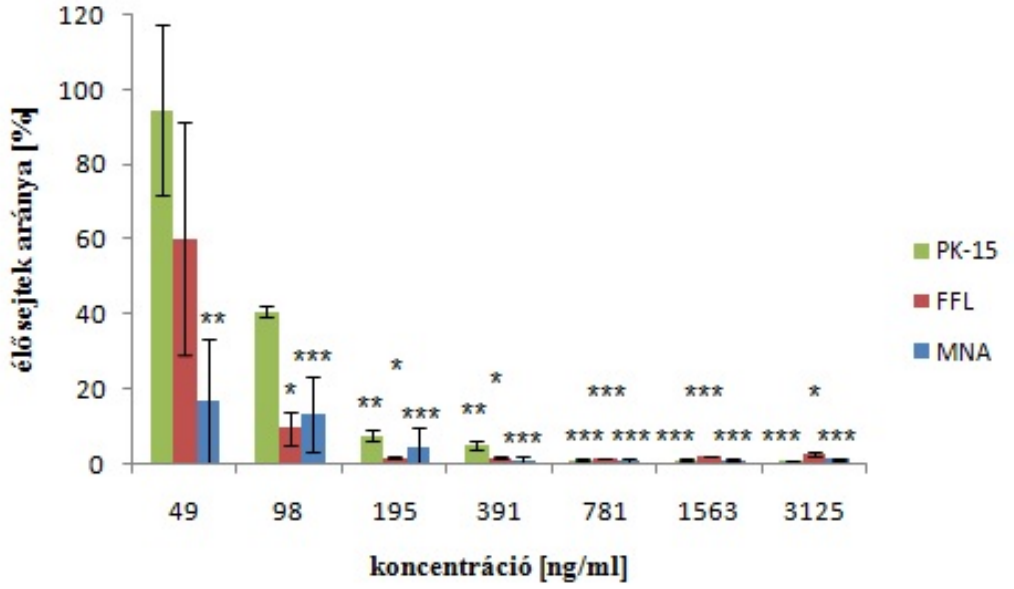



**67. ábra. OPA különleges hatása (500 ng/ml, 400x nagyítás) a hímivarsejteken.**

Összegezve a hímivarsejtes vizsgálatokat megállapíthatjuk, hogy az OPA hatásai inkább mutattak folytonos mintsem éles, lépcsőzetes jelleget: rendkívül alacsony koncentrációban gátolta a hímivarsejtek mozgását; közepes koncentrációban szétkapcsolta a mitokondriális membránpotenciált, és nem utolsó sorban, magas koncentrációban hatására csökkent a plazmamembrán integritás. Mindazonáltal ezek az értékek egy szűk, 250 ng/ml-től 1600 ng/ml-ig terjedő tartományba estek. Emellett fontos figyelembe venni, hogy az OPA nagyon gyorsan fejtette ki hatását a kezelt spermiumokra fiziológiás körülmények között (úszás, 37 °C), mivel a plazmamembrán integritás elvesztése által jelzett toxicitás igen alacsony koncentrációnál (<1 μg/ml) megjelent, ami lehetővé tette, hogy egyéb hímivarsejtre toxikus anyagtól megkülönböztethessük.

### *6.9.4 Az ophiobolinok hatása tumoros sejtvonalakon*

A resazurin-resorufin átalakuláson alapuló viabilitási tesztek nagy korrelációt mutatnak az általánosan használt referencia tesztekkel, mint a formazan- és triciált-timidin módszerek. Munkánk során proliferáló murine neuroblastoma (MNA) (Kulonen és mtsi. 1991), feline fetus lung (FFL) (Andersson és mtsi. 2009) és porcine kidney (PK-15) (Rasimus és mtsi. 2012) sejteket kezeltünk OPA-val. A vizsgált sejtvonalakban rendkívül toxikusnak bizonyult a sejtproliferációra és koncentrációfüggő kinetikát mutatott (**68. ábra**). Az $IC_{50}$ értékek a vizsgált sejtvonalakon különbözőek voltak, MNA esetében <48,8 ng/ml, FFL esetében 48,8 ng/ml, míg a PK-15 sejteknél ez az érték 48,8 ng/ml és 97,6 ng/ml közöttinek bizonyult. Ezen értékek jóval alacsonyabbak, mint amelyek a hímivarsejtek toxicitását és mozgásának gátlását okozzák. Eredményeink azt mutatják, hogy az OPA gátolja az ivarsejtek mozgását és a sejt proliferációt, ami alapján azt feltételezhetjük, hogy az OPA hatással lehet mind az mRNS szintézisére, mind pedig annak transzlációjára a citoplazmában és a mitokondriumban (Gur és mtsi. 2008).

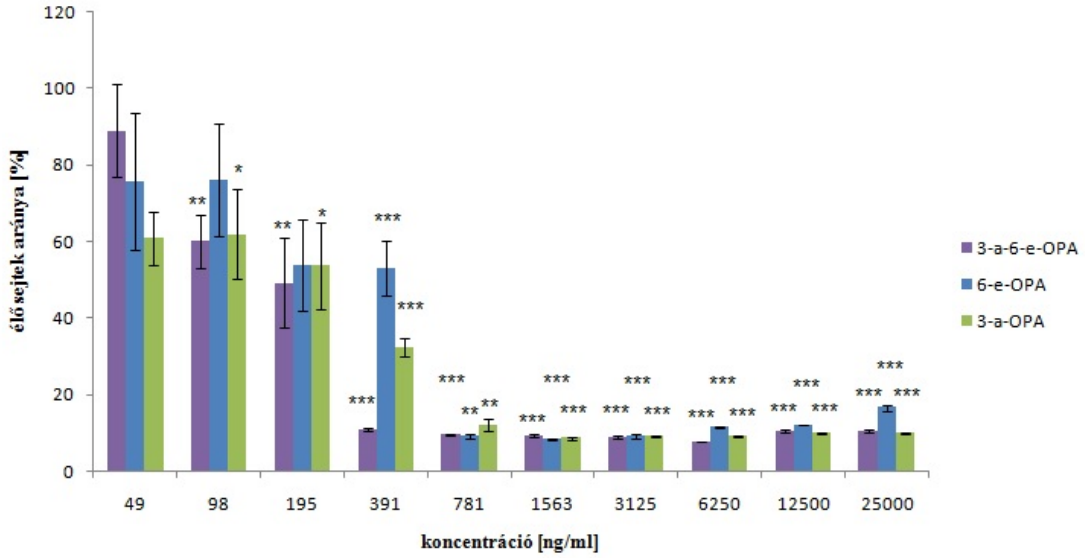



**68. ábra. Az OPA toxikus hatása különböző koncentrációkban feline fetus lung- (piros oszlopok), murine neuroblastoma- (kék oszlopok) és porcine kidney szomatikus sejtvonalakon (zöld oszlopok). * p<0,05;** p<0,01; *** p<0,001**

Amikor OVCAR3 és HUVECs sejteket OPA-val kezelték az életképes sejtek számában szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető rendre $IC_{50}$ 112 µg/ml és 32 µg/ml értékek és tumorspecifitás hiánya mellett (De Vries-van Leeuwen és mtsi. 2010). Továbbá sejthalált indukált L1210 sejtvonalon 4-400 µg/ml koncentrációtartományban, míg $IC_{50}$ 120 µg/ml-nek bizonyult (Fujiwara és mtsi. 2000). Eredményeink alapján az OPA MNA, FFL és PK-15 sejtvonalakkal szemben még a korábban leírt HUVECs, OVCAR3 és L1210 sejtvonalaknál is hatékonyabbnak bizonyult. Összehasonlítva az OPA PK-15 sejtvonalon mért toxicitását ismert gomba toxinok esetében leírt adatokkal, az OPA mutatta a legalacsonyabb toxicitási végpontokat (**18. táblázat**). Figyelembe véve ezen toxinok hatásait mind a spermiumok mozgásában, mind a PK-15 sejteken, a mozgás általában alacsonyabb koncentrációban volt gátolt, míg a PK-15 sejt proliferáció ezen a szinten nem volt gátolt. Az OPA kezelés esetében mindkét esetben tapasztalható volt gátló hatás, már igen alacsony koncentrációban (≤1 µg/ml, **18. táblázat**).

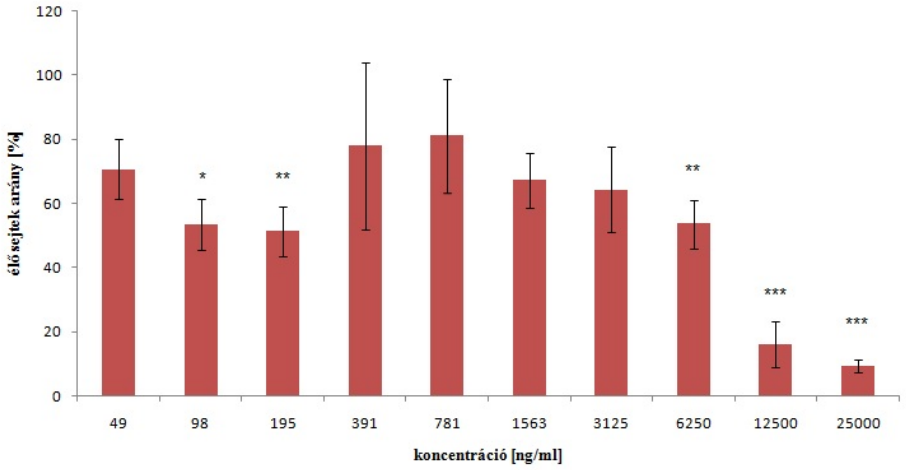
Mivel az FFL sejtvonal kellően érzékenynek bizonyult OPA-val szemben, ezért további négy tisztított ophiobolin származék toxikus hatását teszteltük ezen sejtvonalon. Az OPA-hoz hasonlóan mindegyik tesztvegyület esetében koncentrációfüggő kinetikát lehetett megfigyelni. A 6-e-OPA, 3-a-OPA, valamint 3-a-6-e-OPA $IC_{50}$ értéke egyaránt 195,3 ng/ml-nek adódott, azonban 3-a-6-e-OPA eltérően a többi vizsgált ophiobolin analógtól már 390,6

ng/ml koncentrációban rendkívül toxikusnak bizonyult, az élő sejtek aránya csupán 10,7% volt (**69. ábra**). Ezt az értéket mind a 6-e-OPA mind a 3-a-OPA esetében csupán 781,3 ng/ml koncentrációnál lehetett tapasztalni.




**69. ábra. Egyéb tisztított ophiobolin származékok toxikus hatása különböző koncentrációkban feline fetus lung sejtvonalon.**
*** p<0,05;** p<0,01; *** p<0,001**

Az általunk vizsgált ophiobolin származékok közül az OPI bizonyult a legkevésbé toxikusnak FFL sejtvonallal szemben (**70. ábra**). Bár az $IC_{50}$ érték már 97,7 ng/ml koncentrációnál jelentkezett, azonban az élő sejtek aránya csupán 12,5 µg/ml-nél csökkent 50% alá.




**70. ábra. A tisztított OPI toxikus hatása különböző koncentrációkban feline fetus lung sejtvonalon.**
*** p<0,05;** p<0,01; *** p<0,001**

# 7 Összefoglalás

Az *Ascomycota* törzs *Pleosporales* rendjébe sorolt *Bipolaris* nemzetség tagjai elsősorban fűfélékről, növényi maradványokról és talajból izolálható fonalas gombák. A növényi kórokozóként számon tartott gombák számos változatos biológiai aktivitással rendelkező másodlagos anyagcsereterméket állítanak elő, melyek közül kiemelt jelentőséggel bír a szeszterterpén típusú ophiobolinok családja, melynek tagjai sokféle biológiai aktivitással rendelkező triciklikus (5-8-5) 25-27 szénatomos vegyületek. Napjainkig számos ophiobolin származék került leírásra, közülük kitüntetett figyelem irányul az OPA-ra, mely az elsőként leírt ophiobolin származék. Ez a vegyület számos biológiai aktivitással rendelkezik, többek között antimikrobiális, nematocid, fitotoxikus, citotoxikus, malériaellenes, valamint kalmodulin antagonista hatásokkal.

Munkánk során fő célkitűzésünk az ophiobolin vegyületcsalád tagjairól eddig megszerzett tudományos ismeretek tovább bővítése. Ennek megvalósítása érdekében a következő konkrét célokat tűztük ki és valósítottuk meg:

1. **Az OPA és egyéb ophiobolin analógok detektálására és mennyiségi mérésére alkalmas analitikai HPLC módszer kidolgozása.**

Az ophiobolinok átfogó analitikai vizsgálatához elengedhetetlen egy vagy több megbízható kromatográfiás módszer kidolgozása. A szakirodalomban fellelhető adatok alapján ezen vegyületek minőségi és mennyiségi vizsgálatára folyadékkromatográfiás módszerek kifejlesztése mellett döntöttünk. Mivel távlati céljaink között szerepelt eddig még le nem írt ophiobolin származékok félpreparatív tisztása és azonosítása, így több analitikai mérés módszert dolgoztunk ki a tervezett munkafolyamatok tekintetében. Ennek eredményeképpen sikeresen kidolgoztunk 4 HPLC módszert és elvégeztük ezen módszerek rendszeralkalmassági, rendszerpontossági, valamint linearitási vizsgálatait. Az általunk kidolgozott analitikai HPLC módszerek minden tekintetben megfelelnek a szükséges elválasztástechnikai kritériumoknak.

## 2. Az ophiobolintermelés vizsgálata különböző *Bipolaris, Curvularia és Drechslera* törzsek esetében, a kiemelkedő OPA termelést biztosító törzsek azonosítása.

Az ophiobolinok már több mint 50 éve ismertek, a leírt vegyületek száma az utóbbi években robbanásszerűen növekedett. Bár számos termelő fajt fellelhetünk a szakirodalomban, azonban mind a mai napig nem született a termelési kinetikákat részletező mű. Mindezek alapján szükségesnek éreztük különböző *Bipolaris* és *Curvularia* törzsek OPA termelési kinetikájának jellemzését. A vizsgálatba bevont törzsek tenyésztését PDB tápoldatban valósítottuk meg. A termelt ophiobolinok mennyiségét napi mintavételezés mellett vizsgáltuk. Eredményeink alapján négy alapvető termelési kinetikát sikerült elkülönítenünk. Az első szekréciós mintázat (1. típus) esetén az OPA termelés egy maximum értéket mutatott a tenyésztési időszak ötödik és nyolcadik napja között, majd ezt követően a termelt OPA mennyisége lecsökkent és egy állandó szinten maradt. A második kinetikai mintázatot mutató csoport (2. típus) tagjai esetén a termelt OPA mennyisége az 5-7. napon érte el maximumát, majd ezt követően rövid időn belül drámai mértékű csökkenés következett be és a tenyésztési időszaki további részében nem volt detektálható mennyiségű OPA a fermentlevekben. A harmadik (3. típus) csoport tagjai esetében az OPA szekréciós profil két maximumot mutatott a vizsgált tenyésztési időszak alatt, melyek általában a 3-5. és a 9-10. napokon jelentkeztek. Ezen típusban a két megfigyelt OPA maximum közel azonos volt. A kinetikai vizsgálatokba bevont törzsek közül az 1. típus tagjai voltak a legnagyobb számban, míg a 2. típus a vizsgált izolátumok 17%-át tartalmazta, a 3-as csoportot csupán 2 izolátum jellemezte. A vizsgált törzsek mintegy 30%-a nem bizonyult OPA termelőnek (4. típus) az alkalmazott tenyésztési körülmények között.

Az OPA termelés kinetikájának meghatározása során sikeresen azonosítottunk több kiemelkedő termelési képességekkel rendelkező törzset, melyek közül a *B. oryzae* SZMC 24163-et választottuk ki további, preparatív célú tisztítási kísérletekre.

**3. Az OPA és egyéb ophiobolin analógok tisztítására alkalmas félpreparatív HPLC módszer kidolgozása, és a vizsgálatba bevont kiemelkedő termelési képességű törzsből történő ophiobolin tisztítás megvalósítása, valamint a tisztított vegyületek tömegspektrometriás jellemzése és NMR vizsgálattal történő azonosítása.**

A *B. oryzae* SZMC 24163 jelű törzs bevonásával sikeresen megvalósítottuk az ophiobolinok félpreparatív tisztítását négy sarzsban. Az O1 sarzs esetén az extrakciót követően normál fázisú tisztítást alkalmaztunk első lépésként, majd az egyes frakciókat tovább tisztított fordított fázisú rendszeren. Minden tisztítási lépés végén ellenőriztük az egyes frakciók tisztaságát egy megfelelő analitikai HPLC módszerrel. Az O1 sarzs tisztítása során sikeresen tisztítottunk öt ophiobolin származékot, melyeket tömegspektrometriai vizsgálat, valamint NMR technikával történő szerkezetvizsgálat révén sikeresen azonosítottunk. Az eredmények kiértékelése során megállapítottuk, hogy az általunk tisztított vegyületek név szerint 6-*epi*-ophiobolin A, ophiobolin A, ophiobolin I, 3-anhidro-ophiobolin A és 3-anhidro-6-*epi*-ophiobolin A.

Az O2, O3 és O4 sarzsok tisztítása során a továbbiakban csak fordított fázisú félpreparatív HPLC technikát alkalmaztunk több egymást követő lépésben. Ezen sarzsok tisztításával a már ismert származékokon felül további öt potenciális ophiobolin analóg került kitisztításra. Ezen vegyületek tömegspektrometriai vizsgálatát elvégeztük, és a kapott eredmények alapján feltételezhetjük, hogy mindegyikük az ophiobolinok családjába tartozó másodlagos gombametabolit. Az O2, O3 és O4 sarzsból tisztított vegyületek közül a rendelkezésre álló anyagmennyiségek alapján egy potenciális ophiobolin származék NMR szerkezetvizsgálatát sikerült megvalósítani. Az ISM-08 jelű vegyület NMR adatai alapján kijelenthetjük, hogy ilyen szerkezeti képlettel a mai napig nem került leírásra az ophiobolinok családjába tartozó másodlagos metabolit.

**4. A kiemelkedő ophiobolin termelő képességgel rendelkező *B. oryzae* CBS 310. 64 jelű törzsének optimális tenyésztési körülményeinek megállapítása, különös tekintettel a leoltás módjára, a tenyésztési hőmérsékletre, valamint az alkalmazott szénforrásra.**

A különböző ophiobolin származékok hatékony tisztítása érdekében az általunk kiválasztott jó termelési képességekkel rendelkező törzs optimális tenyésztési körülményeinek meghatározását végeztük el. Ennek első lépéseként az inokulálás módját vizsgáltuk. Két eltérő

leoltási metódust hasonlítottunk össze, a konídiumszuszpenzióval történő leoltást és az agardugóval történő leoltást. A kísérletek eredményeképp megállapítottuk, hogy bár nincs markáns különbség az egyes leoltási eljárások között, azonban a legnagyobb termelt ophiobolin mennyiség érdekében a 2x10 végkoncentrációjú konídiumszuszpenzióval való leoltást tartjuk a legalkalmasabbnak. A tenyésztési hőmérséklet ophiobolintermelésre gyakorolt hatását rázatott tenyészetben, négy eltérő hőmérsékleten (20 °C, 25 °C, 28 °C, 37 °C) vizsgáltuk. A legmagasabb vizsgált tenyésztési hőmérsékleten sem növekedést, sem pedig ophiobolintermelést nem tapasztaltunk. Az teljes ophiobolintermelés szempontjából a 28 °C-on történő tenyésztés eredményezte a legnagyobb termelt ophiobolin mennyiséget, így a továbbiakban ezen hőmérsékletet tekintettük optimálisnak. Az ophiobolintermelés szempontjából optimális szénforrás meghatározása érdekében tíz különböző szénforrást vizsgáltunk (glükóz, fruktóz, maltóz, szacharóz, keményítő, cellobióz, etanol, glicerin, mannitol és Na-acetát). Eredményeink alapján a maltózt tartalmazó tápoldat bizonyult a legoptimálisabbnak, ez eredményezte a legmagasabb termelt ophiobolin mennyiséget.

**5. Az OPA szerves oldószerekben történő bomlásának vizsgálata. Az esetleges bomlástermékek folyadékkromatográfiás azonosítása, valamint keletkezésük ütemének megállapítása.**

A különböző biológiai aktivitások tesztelését célszerű a lehető legnagyobb tisztaságú vegyületekkel elvégezni. Ezek tisztítása során, valamint rövidebb idejű tárolásakor gyakran szerves oldószerekkel érintkeznek. A biotesztek során érdemes külön figyelmet szentelni arra, hogy a tesztelni kívánt vegyület sem a kísérlet előtt, sem pedig az alatt ne szenvedjen bomlást. Mivel a különböző ophiobolin származékok stabilitásáról a szakirodalom csak szűkszavúan nyilatkozik, mindössze két cikk tesz említést az OPA stabilitásáról, azonban egyik sem végzett átfogó vizsgálatot ezen vegyület szeres oldószerekben való stabilitásától, ezért célunk volt felkészülve a biológiai aktivitások tesztelésére az OPA szerves oldószerekbeni stabilitásának vizsgálata. A vizsgálatba hat különböző szerves oldószert vontunk be (MeOH, EtOH, IPA, MeCN, EtOAc, valamint DMSO). A kísérletek eredményeként megállapítható, hogy az OPA első sorban magasabb hőmérsékleten bomlik, főleg alkoholokban. Sikeresen azonosítottunk két fő bomlásterméket, a 6-e-OPA-t és a 3-a-6-e-OPA-t. Továbbá megfigyeltük, hogy különböző szerves oldószerekben történő tároláskor eltérő bomlástermékek jelennek meg.

## 6. A tisztított OPA biológiai aktivitásának vizsgálata vadkan hímivarsejtekkel szemben, valamint három általunk választott szomatikus sejtvonallal szemben.

Az általunk tisztított OPA-t biológiai aktivitás vizsgálatokba vontuk be. Az OPA ivarsejtekkel szembeni toxicitását vadkan hímivarsejtekkel szemben vizsgáltuk. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy már alacsony koncentrációban gátolja azok mozgását, valamint 500 ng/ml koncentrációban a vadkan hímivarsejteket heves, csapkodó mozgásra késztette. Az OPA szomatikus sejtvonalakkal szembeni citotoxicitását három sejtvonal bevonásával vizsgáltuk. Eredményeink alapján kijelenhető, hogy az OPA <48,8 ng/ml koncentrációban toxikus az MNA, 48,8 ng/ml koncentrációban az FFL és 48,8-97,6 ng/ml koncentrációban a PK-15 sejtvonalra.

# 8 Summary

Members of genus *Bipolaris* (*Ascomycota*, *Pleosporales*, *Pleosporaceae*) can be isolated mainly from plants belonging to the family *Poaceae*, plant residues or soil. These filamentous fungi are known as plant pathogens and are able to produce large number of secondary metabolites with various biological activities, from which a remarkable compound family is the sesterterpene-type tricyclic (5-8-5) ophiobolins. Until now, 50 different ophiobolin analogues have been isolated and characterized. The firstly described member of this family was the ophiobolin A, which has multiple biological activities, such as antimicrobial, nematocid, phytotoxic, cytotoxic, antimalarial and calmodulin antagonist effects.

Our main objective was to enrich the scientific knowledge of the members of the ophiobolins related to the production abilities and kinetics of the selected producer strains, their analytical separation, semi-preparative purification, structure elucidation and stability in organic solvents as well as their biological activity. To accomplish this object, we have proposed and realized the following goals:

1. **Developing an analytical HPLC method for detection and quantification of OPA and its analogues.**

For the comprehensive analytical examination of ophiobolins it is crucial to develop one or more reliable chromatographic method. Based on the data in the literature we developed liquid chromatographic methods for qualitative and quantitative analysis of these compounds. Since we have multiple approaches for the examination of ophiobolins including the preparative purification and characterization as well as stability examination multiple analytical methods were developed regarding our workflow. During our study, altogether 4 HPLC methods were successfully developed and their system suitability, precision and linearity were also tested. These HPLC methods meet completely the general analytical requirements.

**2. Examination of the ophiobolin production of selected *Bipolaris, Curvularia and Drechslera* strains, and identification of the strains possessing excellent OPA production capability.**

Ophiobolins are known for more than 50 years, and the number of the reported compounds was dramatically increased in the last decades. Although numerous producing species can be found in the literature, until now the production kinetics of these molecules has not been reported. Therefore, in our work initially the OPA production kinetics of different *Bipolaris* and *Curvularia* strains were investigated and four different types of secretion kinetics were determined. In the case of the first secretion pattern (type 1), the OPA production showed one maximum value between the fifth and eight days of the cultivation, and after that the amount of the produced OPA decreased to a constant level. In the case of the members with the second kinetic pattern (type 2), the amount of the secreted OPA reached its maximum level in the time-range of 5-7 day and followed by a dramatic decrease and was undetectable for the rest of the cultivation period in the ferment broth. For the third group (type 3), the OPA secretion profile showed two maximum points during the examination period, which were usually at day 3-5 and 9-10. In type 3 group the values of maximums were approximately equal. Members of type 1 group represented the largest proportion of the examined strains, while type 2 contained the 17% of the examined microbes. Only two strains were belonging to the type 3 group and 30% of the examined strains were unable to produce OPA under the applied cultivation conditions (type 4).

During the characterization of OPA secretion kinetics we have successfully identified several strains possessing remarkable production capabilities, from which *B. oryzae* SZMC 24163 isolate has been selected for further preparative works.

**3. Developing a semi-preparative HPLC method for the purification of OPA and other ophiobolins as well as the mass spectrometric characterization and NMR examination of the purified compounds.**

The semi-preparative purification of ophiobolins was successfully executed in four separated batch using *B. oryzae* SZMC 24163 as producer strain. In the first case (O1 batch), normal phase separation was applied as first step in the purification after the extraction of the ophiobolins from the ferment broth, which was followed by reversed phase separation. After

each fractionation, the purity of the fractions was determined by the proper analytical method. Five potential ophiobolin analogues have been purified from O1 batch and they have been successfully identified using mass spectrometric examination and NMR technique. During the data evaluation, we have determined that all five purified compounds belong to the family of ophiobolins, and they are 6-*epi*-ophiobolin A, ophiobolin A, ophiobolin I, 3-anhydro-ophiobolin A and 3-anhydro-6-*epi*-ophiobolin A.

In case of batch O2, O3 and O4 only reversed phase separation was used in multiple consecutive steps. Besides the five known ophiobolins five additional potential ophiobolin analogues have been purified from these batches. Mass spectrometric examination of these compounds have been carried out and based on the results we can assume that they are also ophiobolin type secondary fungal metabolites. Due to the available amount of the compounds purified from batch O2, O3 and O4, the NMR examination of one potential ophiobolin analogue has been carried out. Based on the NMR data of ISM-08 we have determined, that it is an ophiobolin-type secondary metabolite, which has not been reported earlier.

**4. Determination of the optimal cultivation conditions of *B. oryzae* SZMC 24163 regarding to the ophiobolin production in consideration of inoculation method, cultivation temperature and applied carbon source.**

Regarding these aims, the investigation of the optimal cultivation conditions of the selected strain was carried out for improved ophiobolin production, which could serve beneficial possibilities for more effective purification of different ophiobolin molecules. Initially the inoculation method was investigated. Two different inoculation procedures have been compared including the inoculation with conidial suspension and with agar plugs. As the result of the experiments, it was determined that there is no significant difference between the two inoculation procedures, however inoculation with suspension of 2x10 conidia/ml is considered the most suitable method to achieve the highest produced ophiobolin content. The effect of the cultivation temperature on the ophiobolin production was examined in liquid media at four different temperatures (20 °C, 25 °C, 28 °C and 37 °C). At the highest examined temperature, there was no mycelial growth and any ophiobolin production. In point of view of the sum-ophiobolin production the cultivation at 28 °C resulted the highest amount of secreted ophiobolins, therefore this temperature was considered as optimal for the further experiments. For the determination of the optimal carbon source in case of ophiobolin

production, ten different carbon sources were monitored (glucose, fructose, maltose, sucrose, starch, cellobiose, ethanol, glycerin, mannitol and sodium-acetate). Based on our results, maltose proved to be the optimal carbon source, because its application resulted in the highest amount of secreted ophiobolin.

**5. Examination of OPA degradation in organic solvents. Identification of the possible degradation products using liquid chromatographic analysis and determination of their formation rate.**

It is expedient to perform different bioassays using compounds with the highest possible purity. These compounds often meet with organic solvent during their purification process or their short term storage. Performing bioassay, it is important to consider the degradation properties of the testing compounds. In the literature few information could be found about the degradation of the different ophiobolin analogues, only two articles reported about the OPA stability, but none of them performed extensive investigation on the degradation of this compound in organic solvents. Therefore, our objective was to investigate the stability of OPA in different organic solvents. Six different organic solvents (MeOH, EtOH, IPA, MeCN, EtOAc and DMSO) were taken into the investigations. Based on the results of the experiments we can determine that OPA degrades primarily in alcohols at high temperature. Two major degradation products have been successfully determined, the 6-e-OPA and 3-a-6-e-OPA.

Furthermore, we have observed that during the storage in different organic solvents different degradation products were forming.

**6. Examination of the biological effects of the purified OPA on boar sperm and three different somatic cell lines.**

The purified OPA was involved in biological activity assays. Bioactivity of OPA was investigated against sperm cells using boar semen and on three types of mammalian cell lines. Based on our results OPA interfered sperm motility at low concentration. Furthermore, intense whipping movement was observed at 500 ng/ml concentration, this phenomenon was not until now described. Furthermore, based on our results OPA was cytotoxic in <48.8 ng/ml

concentration on the MNA cells, in 48.8 ng/ml on the FFL cells and 48.8-97.6 ng/ml on the PK-51 cells.

# 9 Irodalomjegyzék

Alm, K., Taponen, J., Dahlbom, M., Tuunainen, E., Koskinen, E., Andersson, M. A novel automated fluorometric assay to evaluate sperm viability and fertility in dairy bulls. *Theriogenology* **2001**, *56*, 677–684.

Andersson, M. A., Mikkola, R., Raulio, M., Kredics, L., Maijala, P., Salkinoja-Salonen, M. S. Acrebol, a novel toxic peptaibol produced by an *Acremonium exuviarum* indoor isolate. *J. Appl. Microbiol*. **2009**, *106*, 909–923.

Andersson, M. A., Nikulin, M., Köljalg, U., Andersson, M. C., Rainey, F., Reijula, K., Hintikka, E. L., Salkinoja-Salonen, M. Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. *Appl. Environ. Microbiol*. **1997**, *63*, 387–393.

Andersson, M., Mikkola, R., Rasimus, S., Hoornstra, D., Salin, P., Rahkila, R., Heikkinen, M., Mattila, S., Peltola, J., Kalso, S., Salkinoja-Salonen, M. Boar spermatozoa as a biosensor for detecting toxic substances in indoor dust and aerosols. *Toxicol. in Vitro* **2010**, *24*, 2041–2052.

Arai, M., Niikawa, H., Kobayashi, M. Marine-derived fungal sesterterpenes, ophiobolins, inhibit biofilm formation of *Mycobacterium* species. *J. Nat. Med.* **2013**, 67, 271-275

Au, T. K., Chick, W. S. H., Leung, P. C. Initial kinetics of the inactivation of calmodulin by the fungal toxin ophiobolin A . *IJBCB* **2000b**, *32*, 1173-1182.

Au, T. K., Chick, W. S. H., Leung, P. C. The biology of ophiobolins. *Life Sci*. **2000a**, *67*, 733–742.

Au, T. K., Leung, P. C. Identification of the binding and inhibition sites in the calmodulin molecule for ophiobolin A by site-directed mutagenesis. *Plant Phyisol*. **1998**, *118*, 965–973.

Bencsik, O., Papp, T., Berta, _M., Zana, A., Forgó, P., Dombi, Gy., Andersson, M. A., Salkinoja-Salonen M., Vágvölgyi, Cs., Szekeres, A. Ophiobolin A from *Bipolaris oryzae* perturbs motility and membrane integrities of porcine sperm and inducs cell death on mammalian somatic cell lines. *Toxins* **2014**, 6, 2857-2871.

Berbee, M. L., Pirseyedi, M., Hubbard, S. Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, **1999**, *91*, 964–977.

Bladt, T. T., Dürr, C., Knudsen, P. B., Kildgaard S., Frisvad, J. C., Gotfredsen, C. H., Seiffert, M., Larsen, T. O. Bio-Activity and dereplicaion-based dicovery of ophiobolins and other fungal secondary metabolites targeting leukemia cells. *Molecules*, **2013**, *18*, 14629-14650.

Bury, M., Girault, A., Mégalizzi, V., Spiegl-Kreinecker, S., Mathieu, V., Berger, W., Evidente, A., Kornienko, A., Gailly, P., Vandier, C., Kiss, R. Ophiobolin A induces paraptosis-like cell death in human glioblastoma cells by decreasing BKCa channel activity. *Cell Death Dis*. **2013b**, *4*, 561.

Bury, M., Novo-Uzal, E., Andolfi, A., Cimini, S., Wauthoz, N., Heffeter, P., Lallemand, B., Avolio, F., Delporte, C., Cimmino, A., Dubois, J., van Antwerpen, P., Zonno, M. C., Vurro, M., Poumay, Y., Berger, W., Evidente, A., de Gara, L., Kiss, R., Locato, V. Ophiobolin A, a sesterterpenoid fungal phytotoxin, displays higher *in vitro* growth-inhibitory effects in mammalian than in plant cells and displays *in vivo* antitumor activity. *Int. J. Onc.* **2013a**, *43*, 575-585.

Canonica, L., Fiecchi A., Kienle, M. G., Ranzi, B. M., Scala A. The biosynthesis of ophiobolins. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *35*, 3371-3376.

Canonica, L., Fiecchi, A., Kienle, M. G., Scala A. Isolation and constitution of Cochliobolin B. *Tetrahedron Lett.* **1966**, *13*, 1329-1333.

Cheung, W. Y. Cyclic 3’, 5’-Nucleotide Phosphodiesterase: evidence for and properties of a protein activator. J. Biol. Chem. 1971, 246(9), 2859-2869.

Cocucci, S. M., Morgutti, S., Cocucci, M., Gianani, L. Effects of ophiobolin A on potassium permeability, transmembrane electrical potential and proton extrusion in maize roots. *Plant Sci. Lett*. **1983**, *32*, 9–16.

Cutler, H. G., Crumley, F. G., Cox, R. H., Springer, J. P., Arrendale, R. F., Cole, R. J., Cole, P. D. Ophiobolins G and H: New fungal meatbolites from a novel source, *Aspergillus ustus*. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *32*, 778-782.

Csősz, M. Occurence of necrotrophic leaf pathogens in wheat and their relation to symptom developement in Hungary (2000-2002). *Acta Agrobotanica* **2005**, *58*, 11-16.

Dallagnol, L. J., Rodrigues, F. A., Martins, S. C. V., Cavatte, P. C., DaMatta, F. M. Alterations on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. *Australasian Plant Pathol.* **2011**, *40*, 360-365.

De Proost, I., Pintelon, I., Brouns, I., Kroese, A. B., Riccardi, D., Kemp, P. J., Timmermans, J. P., Adriaensen, D. Functional live cell imaging of the pulmonary neuroepithelial body microenvironment. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. **2008**, *39*, 180–189.

De Vries-van Leeuwen, I. J., Kortekaas-Thijssen, C., Nzigou Mandouckou, J. A., Kas, S., Evidente, A., de Boer, A. H. Fusicoccin-A selectively induces apoptosis in tumor cells after interferon-a priming. *Cancer Lett*. **2010**, *293*, 198–206.

Ellis, M. B. (1971). Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute: Kew, Surrey, UK.

Emter, R., Natsch, A. A fast Resazurin-based live viability assay is equivalent to the MTT-test in the KeratinoSens assay. *Toxicology in Vitro* **2015**, *29*, 688–693

Evidente, A., Andolfi, A., Cimmino, A., Vurro, M., Fracchiola, M., Charudattan, R. Herbicidal potential of ophiobolins produced by *Drechslera gigantea*. *J. Agric. Food Chem*. **2006**, *54*, 1779–1783.

Fujiwara, H., Matsunaga, K., Kumagai, H., Ishizuka, M., Ohizumi, Y. Ophiobolin A, a novel apoptosis-inducing agent from fungus strain f-7438. *Pharm. Pharmacol. Commun*. **2000**, *6*, 427–431.

Gunewald, S., Kriegel, C., Baumann, T., Glander, H. J., Paasch, U. Interactions between apoptotic signal transduction and capacitation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* **2009**, *0*, 1-8.

Gur, Y., Bretbart, H. Protein synthesis in sperm: Dialog between mitochondria and cytoplasm. *Mol. Cell Endocrinol*. **2008**, *282*, 45–55.

Hoornstra, D., Andersson, M. A., Mikkola, R., Salkinoja-Salonen, M. S. A new method for *in vitro* detection of microbially produced mitochondrial toxins. *Toxicol. in Vitro* **2003**, *17*, 745–751.

Houdkova, M., Rondevaldova, J., Doskocil, I., Kokoska, L. Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. Fitoterapia 2017 doi: 10.1016/j.fitote.2017.02.008

Ikeda R., Sugita T., Jacobson E. S., Shinoda T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiol. Immunol.* **2003**, *47*, 271-277.

Itai, A., Nozoe, S., Tsuda, K., Okuda, S., Iitaka, Y., Nakayama, Y. The structure of cephalonic acid, a pentaprenyl terpenoid. Tetrahedron Lett. **1967**, *42*, 4111-4112.

K. Ishlbashl, Studies on antibiotics from *Helminthosporium* sp. Fungi III. Ophiobolin production by Helminthosporium tuarcicum., *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **1961**, *35*, 323-326

Ishibashi, K. Studies on antibiotics from *Helminthosporium* sp. Fungi V. Zizanin, a new antifungal antibiotic produced by *Helminthosporium zizaniae*. *J. Antibiotics* **1962,** *15*, 88-92.

Jayasuriya, H., Herath, K. B., Ondeyka, J. G., Polishook, J. D., Bills, G. F., Dombrowski, A. W., Springer, M. S., Siciliano, S., Malkowitz, L., Sanchez, M., Guan, Z., Tiwari, S., Stevenson, D. W., Borris, R. P., Singh, S. B. Isolation and Structure of Antagonists of Chemokine Receptor (CCR5). *J. Nat. Prod.* **2004,** *67*, 1036-1038.

Jestoi, M. Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nut*. **2008**, *48*, 21–49.

Kim, H. J., Kim, J. C., Kim, B. S., Kim, H. G., Cho, K. Y. Antibiotic and phytotoxic activities of ophiobolins from *Helminthosporium* species. *Plant Pathol. J.* **1999**, *15(1)*, 14-20.

Kim, J. M., Hyeon, S. B., Isogai, A. Suzuki, A. Isolation of ophiobolin A and its analogues as inhibitors of photosynthesis. Agric. Biol. Chem. 1984, 48(3), 803-805.

Koncz, I., Kajati, I., Princzinger, G., Rátkai, B. A kukorica új helmintospóriumos betegsége Magyarországon (kórokozó: *Helminthosporium cabonum* Ullstrup). *Növényvédelem* **1974**, *10*, 241-248.

Kopper L., Schaff, Zs. Patológia I-II. *Medicina Kiadó* **2004**, 618

Kulonen, K., Neuvonen, E., Topi, M. Methods for detecting arctic rabies virus in dilution series of field samples. *J. Virol. Methods* **1991**, *32*, 149–155.

Kumar, J., Schäfer, P., Hückelhoven, R., Langen, G., Baltruschat, H., Stein, E., Nagaraja, S., Koegel, K H. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. Molecular Plant Pathology **2002**, *3(4)*, 185-195.

Leitgeb, B., Szekeres, A., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Kredics, L. The history of alamethicin: A review of the most extensively studied peptaibol. *Chem. Biodiv*. **2007**, *4*, 1027–1051.

Leung, P. C., Graves, L. M., Tipton, C. L. Characterization of the interaction of ophiobolin A and calmodulin. *Int. J. Biochem.* **1988**, *20(12)*, 1351-1359.

Leung, P. C., Taylor, W. A., Wang, J. H., Tipton, C. L. Ophiobolin A: a natural inhibitor of calmodulin. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259(5)*, 2742-2747.

Leung, P. C., Taylor, W. A., Wang, J. H., Tipton, C. L. Role of calmodulin inhibition int he mode of action of ophiobolin A. *Plant Physiol.* **1985**, *77*, 303-308.

Li, E., Clark, A. M., Rotella, D. P., Hufford, C. D. Microbial metabolites of ophiobolin A and antimicrobial evaluation of ophiobolins. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 74–81.

Liu, H. B., Edrada-Ebel, R. A., Ebel, R., Wang, Y., Schulz, B., Draeger, S., Müller, W. E. G., Wray, V., Lin, W. H., Proksch, P. ophiobolin sesterterpenoids and pyrrolidin alkaloids from the sponge-derived fungus *Aspergillus ustus*. *Helv. Chim. Acta* **2011**, *94*, 623-631.

Liu, X. H., Miao, F. P., Qiao, M. F., Cichewicz, R. H., Ji, N. Y. Terretonin, ophiobolin, and drimane terpenes with absolute configurations from an algicolous *Aspergillus ustus*. *RSC Advances*, **2013**, *3*, 588-595.

Lombard, J., Moreira, D. Origins and early evolution of the mecalonate pathway of isoprenoid biosynthesis int he three domains of life. *Mol. Biol. Evol.* **2011**, *28(1)*, 87-99

Lv, C., Quin, W., Zhu, T., Wei, S., Hong, K., Zhu, W., Chen, R., Huang, C. Ophiobolin O Isolated from *Aspergillus ustus* Induces G1 Arrest of MCF-7 Cells through Interaction with AKT/GSK3β/Cyclin D1 Signaling. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 431-443.

Manamgoda, D. S., Cai L., McKenzie, E. H. C., Crous, P. W., Madrid, H., Chukeatirote, E., Shivas, R. G., Tan, Y. P., Hyde, K. D. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia Complex. *Fungal Diversity* **2012**, *56*, 131-144.

Manamgoda, D. S., Rossman, A. Y., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Madris, H., Chukeatirote, E., Hyde, K. D. The genus *Bipolaris*. *Stud Mycol* **2014**, **79**, 221-288.

Mikkola, R., Andersson, M. A., Kredics, L., Grigoriev, P., Sundell, N., Salkinoja-Salonen, M. S. 20-Residue and 11-residue peptaibols from the fungus *Trichoderma longibrachiatum* are synergistic in forming Na+/K+-permeable channels and adverse action towards mammalian cells. *FEBS J.* **2012**, *279*, 4172–4190.

Nakamura M., Ishibashi K. On the new antibiotics „ophiobolin”, produced by *Ophiobolus miyabeanus J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **1958**, *32*, 739–744.

Nozoe, S., Hirai, K., Tsuda, K. The structure of zizannin-A and -B, $C_{25}$-terpenoids isolated from *Helminthosporium zizaniae. Tetrahedron Lett.* **1966**, *20*, 2211-2216.

Nozoe, S., Itai, A., Tsuda, K., Okuda, S. The chemical transformation of cephalinic acid. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *42*, 4113-4117.

Nozoe, S., Morisaki, M., Fukushima, K., Okuda, S. The isolation of an acyclic C-25 isoprenoid alcohol, geranylnerolidol, and a new ophiobolin. *Tetrahedron Lett.* **1968a**, *42*, 4457–4458.

Nozoe, S., Morisaki, M., Okuda, S., Tsuda, K. Biosynthesis of ophiobolins from doubly labeled mevalonate. *Tetrahedron Lett.* **1968b**, *19*, 2347–2349.

Orsenigo, M. Extraction and purification of cochliobolin, a toxic product from *Helminthosporium oryzae*. *Phytopath. Z.* **1957**, *29*, 189-196

Padmanabhan, S. Y., The great Bengal famine. *Ann. Rev. Phytopathol.* **1973**, *11*, 11-26.

Pena-Rodriguez, L. M., Chilton, W. S. 3-anhydroophiobolin A and 3-anhydro-6-*epi*-ophiobolin A, phytotoxic metabolites of the johnson grass pathogen *Bipolaris sorghicola*. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52(5)*, 1170-1172.

Phuwapraisirisan, P., Sawang, K., Siripong, P., Tip-pyang, S. Anhydrocochlioquinone A, a new antitumor compound from *Bipolaris oryzae*. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5193-5195.

Pinkerton, F., Strobel, G. Serinol as an activator of toxin production in attenuated cultures of *Helminthosporium sacchari*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1976**, *73(11)*, 4007-4011.

Rasimus, S., Mikkola, R., Andersson, M. A., Teplova, V. V., Venediktova, N., Ek-Kommonen, C., Salkinoja-Salonen, M. Psychrotolerant *Paenibacillus tundrae* isolates from barley grains produce new cereulide-like depsipeptides (paenilide and homopaenilide) that are highly toxic to mammalian cells. *Appl. Environ. Microbiol*. **2012**, *78*, 3732–3743.

Rossi, C., Tuttobello, L. A new natural ophiobolin. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *3*, 307-308.

Shen, X., Krasnoff, S. B., Lu, S. W., Dunbar, C. D., O'Neal, J., Turgeon, B. G., Yoder, O. C., Gibson, D. M., Hamann, M. T. Characterization of 6-*epi*-3-anhydroophiobolin B from *Cochliobolus heterostrophus. J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 895–897.

Singh, S. B., Jayasuriya, H., Dewey, R., Polishook, J. D., Dombrowski, A. W., Zink, D. L., Guan, Z., Collado, J., Platas, G., Pelaez, F., Felock, P. J., Hazuda, D. J. Isolation, structure, and HIV-1-integrase inhibitory activity of structurally diverse fungal metabolites. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **2003**, *30*, 721–731.

Singh, S. B., Smith, J. L., Sabnis, G. S., Dombrowski, A. W., Schaeffer, J. M., Goetz, M. A. Bills, G. F. Structure and conformation of ophiobolin K and 6-*epi*ophiobolin K from *Aspergillus ustus* as a nematocidal agent. *Tetrahedron* **1991**, *47(34)*, 6931-6938.

Sivanesan, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers* **1987**, *158*, 1–261.

Sugawara, F., Strobel, G., Strange, R. N., Siedow, J. N., Van Duyne, G. D., Clardy J. Phytotoxins from the pathogenic fungi *Drechslera maydis* and *Drechslera sorghicola. Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 3081-3085

Sugawara, F., Takahasi, N., Strobel, G., Yun, H. C., Gray, G., Fu, Y., Clardy, J. Some new phytotoxic ophiobolins produced by *Drechslera oryzae*. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2170-2172.

Tatum, L. A. The southetn corn leaf blight epidemic. *Science* **1971**, *171*, 1113-1116

Tipton, C. L., Paulsen, P. V., Betts, R. E. Effects of ophiobolin A on ion leakage and hexose uptake by maize roots. *Plant Physiol*. **1977**, *59*, 907–910.

Tonshin, A., Teplova, V., Andersson, M., Salkinoja-Salonen, M. S. The *Fusarium* mycotoxins enniatins and beauvericin cause mitochondrial dysfunction by affecting the mitochondrial volume regulation, oxidative phosphorylation and ion homeostasis. *Toxicology* **2010**, *276*, 49–57.

Tsipouras, A., Adefarati, A. A., Tkacz, J. S., Frazier, E. G., Rohrer, S. P., Birzin, E., Rosegay, A., Zink, D. L., Geotz, M. A., Singh, S. B., Schaeffer, J. M. Ophiobolin M and analogues, noncompetitive inhibitors of ivermectin binding with nematocidal activity. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 531–536.

Tsuda, K., Nozoe, S., Morisaki, M., Hirai, K., Itai, A., Okuda, S., Canonica, L., Fiecchi, A., Galli, M., Scala, A. Nomenclature of ophiobolins. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *35*, 3369-3370.

Wang, Q. X., Bao, L., Yang, X. L., Liu, D. L., Guo, H., Dai, H. Q., Song, F. H., Zhang, L. X., Guo, L. D., Li, S. J., Liu, H. W. Ophiobolins P-T, five new and antibacterial sesterterpenes from the endolichenic fungus *Ulocladium* sp. *Fitoterapia* **2013a**, *90*, 220-227.

Wang, Q. X., Yang, J. L., Qi, Q. Y., Bao, L., Yang, X. L., Liu, M. M., Huang, P., Zhang, L. X., Chen, J. L., Cai, L., Liu, H. W. 3-Anhydro-6-hydroxy-ophiobolin A, a new sesterterpene inhibiting the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and inducing the cell

death by apoptosis on K562, from the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2013b**, *23*, 3547–3550.

Wang, S., Luo, X., Yan, R., Wang, Q., Qi, Q., Chi, X., Zhang, L., Yu, Z., Cai, B., Chen, J. L., Liu, H. 3-Anhydro-6-hydroxy-ophiobolin A displays high in vitro and in vivo efficacy against influenza A virus infection. *Protein Cell* **2016**, *7(11)*, 839-843.

Wei, H., Itoh, T., Kinoshita, M., Nakai, Y., Kurotaki, M., Kobayashi, M. Cytotoxic sesterterpenes, 6-*epi*-ophiobolin G and 6-*epi*-ophiobolin N, from marine derived fungus *Emericella variecolor* GF10. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6015–6019.

Xiao, J. Z., Tsuda, M., Doke, N., Nishimura, S. Phytotoxin produced by germinating spores of *Bipolaris oryzae*. *Phytopathology* **1991**, *81(1)*, 58-64

Yang, T., Lu, Z., Meng, L., Wei, S., Hong, K., Zhu, W., Huang, C. The novel agent ophiobolin O induces apoptosis and cell cycle arrest of MCF-7 cells through activation of MAPK signaling pathways. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2012**, *22*, 579–585.

Yun, C. H., Sugawara, F., Strobel, G. A. The phytotoxic ophiobolins prduced by *Drechslera oryzae*, their structures and biological activity in rice. *Plant Science* **1988**, *54*, 237-243.

Zeng, H. T., Tulsiani, D. R. Calmodulin antagonists differentially affect capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation of mouse sperm components. *J. Cell Sci*. **2003**, *116*, 1981–1989.

Zhang, D., Fukuzawa, S., Satake, M., Li, X., Kuranaga, T., Niitsu, A., Yoshizawa, K., Tachibana, K. Ophiobolin O and 6-*epi*-ophiobolin O, two new cytotoxic sesterterpenes from the marine derived fungus Aspergillus sp. *NPC* **2012**, *7(0)*, 1-4.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette munkámat a tanszéken.

Hálával tartozom témavezetőimnek, Dr. Papp Tamásnak és Dr. Szekeres Andrásnak áldozatos munkájukért, odaadó és fáradhatatlan szakmai támogatásukért, valamint, hogy megosztották velem széleskörű elméleti és gyakorlati szaktudásukat és megadott minden segítséget munkám sikeres elvégzéséhez.

Köszönöm minden közvetlen munkatársamnak, Kecskeméti Anitának, Berta Máténak, Kalló Rékának, Dám Annamáriának és Váradi Orsolyának a laborban nyújtott nélkülözhetetlen segítségüket, barátságukat.

Köszönettel tartozom Prof. Mirja Salkinoja-Salonennek és Dr. Maria Anderssonnak, hogy lehetővé tették a citotoxicitási vizsgálatok elvégzését, illetve a technika elsajátítását a Helsinki Egyetemen.

Külön köszönet illeti Dr. Dombi Györgyöt, Dr. Forgó Pétert és Zana Annamáriát az NMR vizsgálatokban nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért.

Köszönetemet fejezem ki Lele Máriának, Deákné Kulcsár Melindának, valamint Farkas Elvirának a munkám során nyújtott technikai segítségért, valamint Dr. Palágyi Andrásnénak, Szőnyi Jánosnénak és Lengyel Boglárkának, hogy a munkámmal kapcsolatos hivatalos ügyeket intézték. Köszönet illeti továbbá a Mikrobiológiai Tanszék minden munkatársát és dolgozóját.

És végül, de nem utolsó sorban hálával és köszönettel tartozom szüleimnek, testvéremnek, akik egész életem folyamán önzetlenül támogattak, és szeretetükkel mindvégig biztos hátteret nyújtottak.

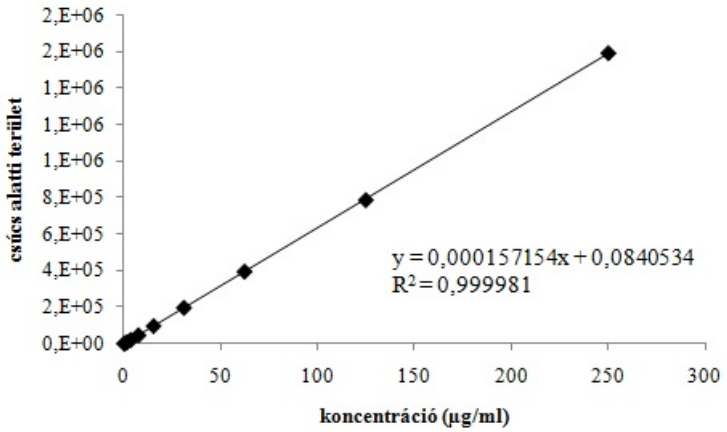
A dolgozattal kapcsolatos kutatásokat az „Új utak a természetes anyag alapú gyógyszerkutatásban: Rendszermetabolomikai megközelítések növényi és mikrobiális eredetű bioaktív terpenoidok felkutatására.” című, GINOP-2.3.2-15-2016-00012 számú projekt támogatta. Valamint az infrastruktúrális hátteret a GINOP-2.3.3-15-2016-00006 számú, „Mikrobiális génbankoz kapcsolódó integrált élettudományi és hatóanyag kutatás-fejlesztési centrum” című pályázat biztosította.

# 10 Mellékletek

**1. Melléklet. Az OPA termelési vizsgálata során alkalmazott HPLC módszer rendszeralkalmassági paraméterei.**

| | $t_R$ | $r_G$ | $k'$ | $R_S$ | $A_S$ | $W_h$ | $N$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **OPA** | 14,95 | 1,00 | 5,61 | 1,73 | 0,94 | 0,24 | 20044 |

**2. Melléklet. Az OPA termelés vizsgálata során használt analitikai HPLC módszer kalibrációs egyenese.**




**3. Melléklet. Az OPA termelési vizsgálata során alkalmazott kalibráció linearitásának ellenőrzése.**

| *csúcs alatti terület* | *számított koncentráció [µg/ml]* | *bemért koncentráció [µg/ml]* | *eltérés [%]* |
|---|---|---|---|
| **2883** | 0,54 | 0,49 | 10,00 |
| **5821** | 1,00 | 0,98 | 2,28 |
| **11859** | 1,95 | 1,95 | -0,28 |
| **24244** | 3,89 | 3,91 | -0,31 |
| **49566** | 7,87 | 7,81 | 0,78 |
| **99834** | 15,77 | 15,63 | 0,95 |
| **199508** | 31,44 | 31,25 | 0,60 |
| **397658** | 62,58 | 62,50 | 0,12 |
| **788882** | 124,06 | 125,00 | -0,75 |
| **1592876** | 250,41 | 250,00 | 0,16 |

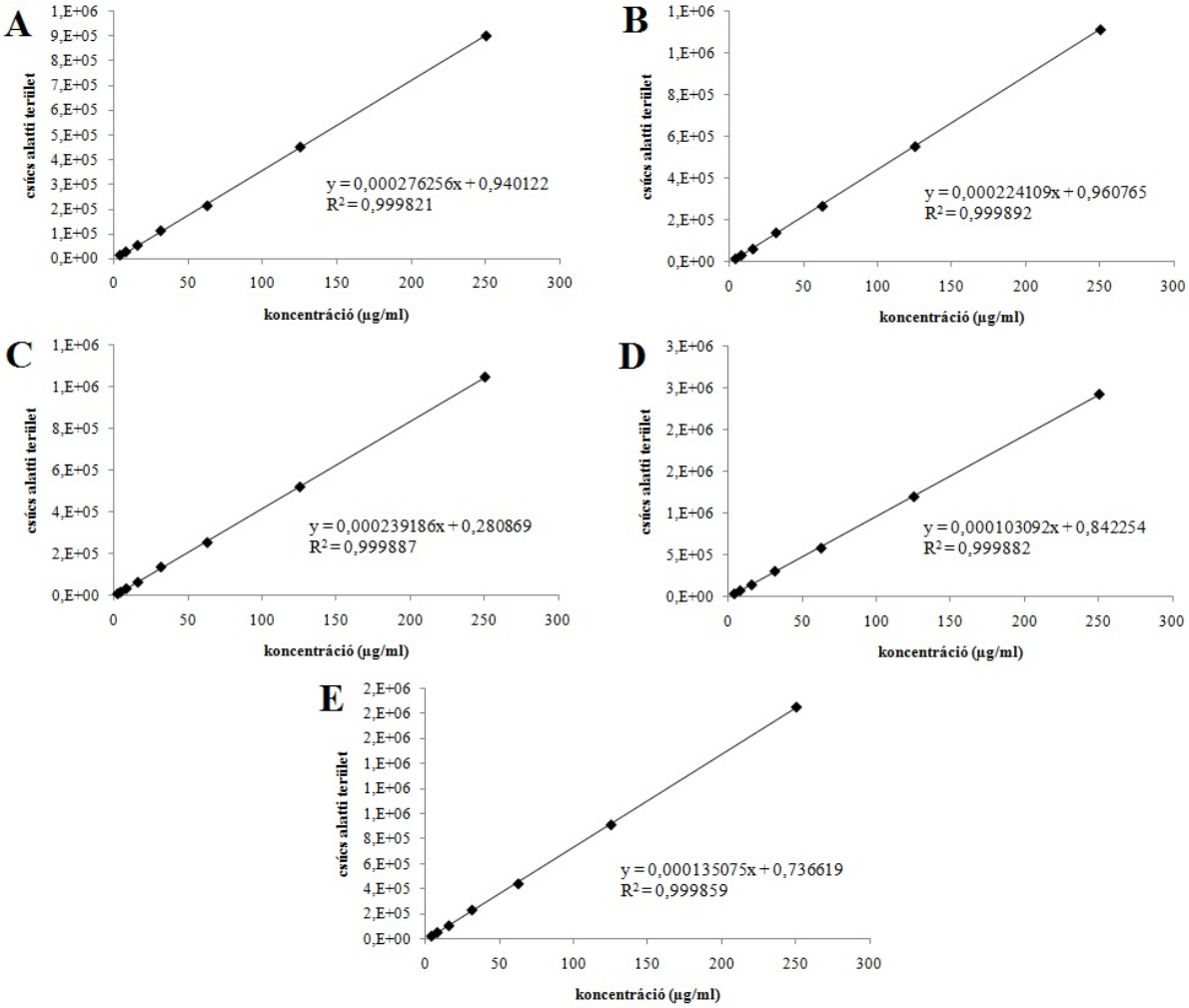
**4. Melléklet Az OPA termelés vizsgálata során használt analitikai HPLC módszer rendszerpontosságának számításai.**

| | ***OPA*** | |
|---|---|---|
| | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület |
| **1.** | 14,95 | 404192 |
| **2.** | 14,95 | 405467 |
| **3.** | 14,90 | 405325 |
| **Átlag** | 14,93 | 404994,67 |
| **SD** | 0,03 | 698,75 |
| **RSD %** | **0,18** | **0,17** |
| **Elfogadási feltétel** | RSD <1% | RSD <10% |

**5. Melléklet. Az optimális tenyésztési körülmények meghatározása során alkalmazott HPLC módszer rendszeralkalmassági paraméterei.**

| | $t_R$ | $r_G$ | $k'$ | $R_S$ | $A_S$ | $W_h$ | $N$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **6-e-OPA** | 8,98 | 0,92 | 5,11 | 5,26 | 1,41 | 0,20 | 11311 |
| **OPA** | 9,73 | 1,00 | 5,62 | 2,15 | 1,54 | 0,21 | 11599 |
| **OPI** | 11,33 | 1,16 | 6,71 | 4,06 | 1,41 | 0,25 | 11342 |
| **3-a-OPA** | 12,95 | 1,33 | 7,81 | 3,64 | 1,35 | 0,27 | 12428 |
| **3-a-6-e-OPA** | 14,36 | 1,48 | 8,77 | 2,88 | 1,28 | 0,30 | 12542 |

**6. Melléklet. Az optimális tenyésztési körülmények megállapítása során alkalmazott HPLC módszer kalibrációs egyenesei: 6-OPA (A), OPA (B), OPI (C), 3-a-OPA (D) és 3-a-6-e-OPA (E).**



**7. Melléklet. Az optimális tenyésztési körülmények vizsgálata során alkalmazott kalibrációk linearitásának ellenőrzése.**

| *vegyület* | *csúcs alatti terület* | *számított koncentráció [µg/ml]* | *bemért koncentráció [µg/ml]* | *eltérés [%]* |
|---|---|---|---|---|
| **6-e-OPA** | 13078 | 4,55 | 3,91 | 16,56 |
| | 26871 | 8,36 | 7,81 | 7,05 |
| | 52720 | 15,50 | 15,63 | -0,77 |
| | 112190 | 31,93 | 31,25 | 2,19 |
| | 213321 | 59,87 | 62,50 | -4,21 |
| | 451618 | 125,70 | 125,00 | 0,56 |
| | 902158 | 250,17 | 250,00 | 0,07 |
| **OPA** | 15681 | 4,48 | 3,91 | 14,56 |
| | 32417 | 8,23 | 7,81 | 5,29 |
| | 62337 | 14,93 | 15,63 | -4,44 |
| | 140241 | 32,39 | 31,25 | 3,65 |
| | 267121 | 60,82 | 62,50 | -2,68 |
| | 553209 | 124,94 | 125,00 | -0,05 |
| | 1112613 | 250,31 | 250,00 | 0,12 |
| **OPI** | 7471 | 2,07 | 1,95 | 5,87 |
| | 15977 | 4,10 | 3,91 | 5,02 |
| | 32192 | 7,98 | 7,81 | 2,15 |
| | 62721 | 15,28 | 15,63 | -2,19 |
| | 136001 | 32,81 | 31,25 | 4,99 |
| | 252967 | 60,79 | 62,50 | -2,74 |
| | 519708 | 124,59 | 125,00 | -0,33 |
| | 1045825 | 250,43 | 250,00 | 0,17 |
| **3-a-OPA** | 34542 | 4,40 | 3,91 | 12,72 |
| | 72524 | 8,32 | 7,81 | 6,48 |
| | 141735 | 15,45 | 15,63 | -1,09 |
| | 304952 | 32,28 | 31,25 | 3,30 |
| | 581528 | 60,79 | 62,50 | -2,73 |
| | 1196225 | 124,16 | 125,00 | -0,67 |
| | 2423450 | 250,68 | 250,00 | 0,27 |
| **3-a-6-e-OPA** | 26996 | 4,38 | 3,91 | 12,21 |
| | 55880 | 8,28 | 7,81 | 6,04 |
| | 109510 | 15,53 | 15,63 | -0,62 |
| | 234787 | 32,45 | 31,25 | 3,84 |

| *vegyület* | *csúcs alatti terület* | *számított koncentráció [µg/ml]* | *bemért koncentráció [µg/ml]* | *eltérés [%]* |
|---|---|---|---|---|
| | 443408 | 60,63 | 62,50 | -2,99 |
| | 913180 | 124,08 | 125,00 | -0,73 |
| | 1850781 | 250,73 | 250,00 | 0,29 |

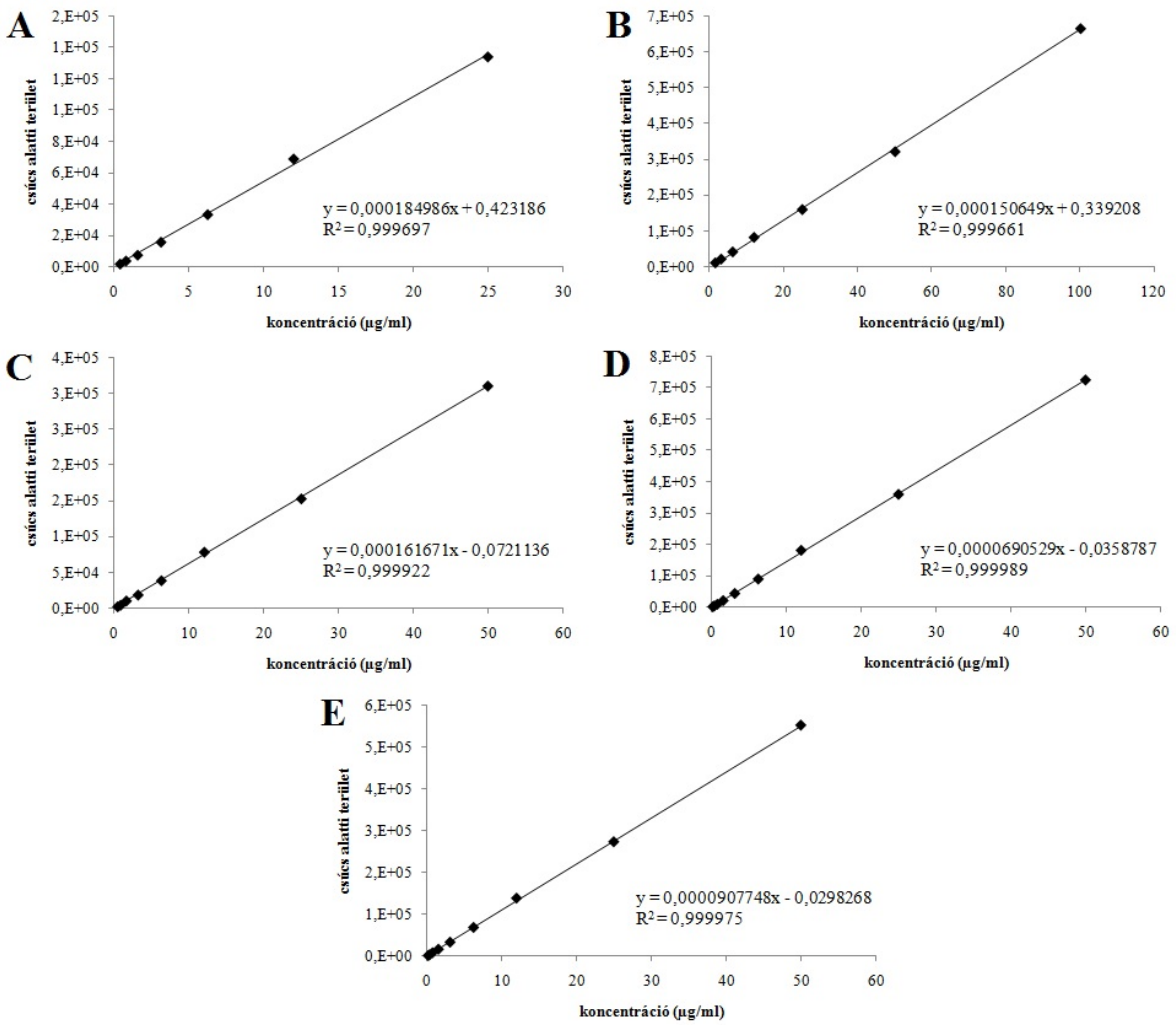
**8. Melléklet. A tenyésztési körülmények vizsgálata során használt analitikai HPLC módszer rendszerpontosságának számításai.**

| | *6-e-OPA* | | *OPA* | | *OPI* | | *3-a-OPA* | | *3-a-6-e-OPA* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület |
| **1.** | 8,98 | 56812 | 9,73 | 71573 | 11,33 | 67567 | 12,95 | 151996 | 14,36 | 117062 |
| **2.** | 9,11 | 56770 | 9,87 | 71186 | 11,49 | 67560 | 13,15 | 153422 | 14,57 | 118792 |
| **3.** | 8,99 | 56619 | 9,75 | 71118 | 11,35 | 68428 | 12,97 | 153048 | 14,38 | 117365 |
| **Átlag** | 9,03 | 56733,67 | 9,78 | 71292,33 | 11,39 | 67851,67 | 13,02 | 152822,00 | 14,44 | 117739,67 |
| **SD** | 0,07 | 101,50 | 0,08 | 245,43 | 0,09 | 499,13 | 0,11 | 739,38 | 0,12 | 923,85 |
| **RSD %** | **0,76** | **0,18** | **0,78** | **0,34** | **0,79** | **0,74** | **0,83** | **0,48** | **0,83** | **0,78** |
| **Elfogadási feltétel** | RSD <1% | RSD <10% | RSD <1% | RSD <10% | RSD <1% | RSD <10% | RSD <1% | RSD <10% | RSD <1% | RSD <10% |

**9. Melléklet. Az OPA stabilitásának vizsgálata során alkalmazott HPLC módszer rendszeralkalmassági paraméterei.**

| | $t_R$ | $r_G$ | $k'$ | $R_S$ | $A_S$ | $W_h$ | $N$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **6-e-OPA** | 13,36 | 0,93 | 4,91 | 1,47 | 0,95 | 0,21 | 20840 |
| **OPA** | 14,39 | 1,00 | 5,37 | 2,72 | 0,97 | 0,23 | 21557 |
| **OPI** | 17,35 | 1,21 | 6,68 | 3,27 | 0,97 | 0,27 | 22397 |
| **3-a-OPA** | 19,98 | 1,39 | 7,84 | 2,79 | 0,95 | 0,31 | 22286 |
| **3-a-6-e-OPA** | 22,08 | 1,53 | 8,77 | 2,21 | 0,95 | 0,35 | 21859 |

**10. Melléklet. Az OPA bomlásának vizsgálata során alkalmazott HPLC módszer kalibrációs egyenesei: 6-OPA (A), OPA (B), OPI (C), 3-a-OPA (D) és 3-a-6-e-OPA (E).**



**11. Melléklet. Az OPA bomlásának vizsgálata során alkalmazott kalibrációk linearitásának ellenőrzése.**

| *vegyület* | *csúcs alatti terület* | *számított koncentráció [µg/ml]* | *bemért koncentráció [µg/ml]* | *eltérés [%]* |
|---|---|---|---|---|
| **6-e-OPA** | 2157 | 0,42 | 0,39 | 8,34 |
| | 4098 | 0,78 | 0,78 | 0,13 |
| | 7841 | 1,47 | 1,56 | -5,62 |
| | 16118 | 3,01 | 3,13 | -3,82 |
| | 33655 | 6,25 | 6,25 | 0,00 |
| | 69168 | 12,82 | 12,00 | 6,83 |
| | 134228 | 24,85 | 25,00 | -0,58 |
| **OPA** | 10284 | 1,89 | 1,56 | 20,86 |
| | 20984 | 3,50 | 3,13 | 12,01 |
| | 41083 | 6,53 | 6,25 | 4,45 |
| | 81762 | 12,66 | 12,00 | 5,47 |
| | 159662 | 24,39 | 25,00 | -2,43 |
| | 321672 | 48,80 | 50,00 | -2,40 |
| | 666006 | 100,67 | 100,00 | 0,67 |
| **OPI** | 2843 | 0,39 | 0,39 | -0,80 |
| | 5050 | 0,74 | 0,78 | -4,73 |
| | 10922 | 1,69 | 1,56 | 8,39 |
| | 19221 | 3,04 | 3,13 | -2,87 |
| | 39214 | 6,27 | 6,25 | 0,28 |
| | 78891 | 12,68 | 12,00 | 5,69 |
| | 153196 | 24,70 | 25,00 | -1,22 |
| | 310357 | 50,10 | 50,00 | 0,21 |
| **3-a-OPA** | 3238 | 0,19 | 0,20 | -3,89 |
| | 6334 | 0,40 | 0,39 | 2,78 |
| | 11257 | 0,74 | 0,78 | -5,09 |
| | 22969 | 1,55 | 1,56 | -0,79 |
| | 45566 | 3,11 | 3,13 | -0,46 |
| | 91610 | 6,29 | 6,25 | 0,64 |
| | 183017 | 12,60 | 12,00 | 5,02 |
| | 361122 | 24,90 | 25,00 | -0,40 |
| | 724899 | 50,02 | 50,00 | 0,04 |
| **3-a-6-e-OPA** | 2272 | 0,18 | 0,20 | -9,68 |
| | 4536 | 0,38 | 0,39 | -2,23 |
| | 9367 | 0,82 | 0,78 | 5,02 |
| | 17556 | 1,56 | 1,56 | 0,08 |
| | 34348 | 3,09 | 3,13 | -1,18 |
| | 69469 | 6,28 | 6,25 | 0,42 |
| | 139372 | 12,62 | 12,00 | 5,18 |
| | 273733 | 24,82 | 25,00 | -0,73 |
| | 551780 | 50,06 | 50,00 | 0,12 |

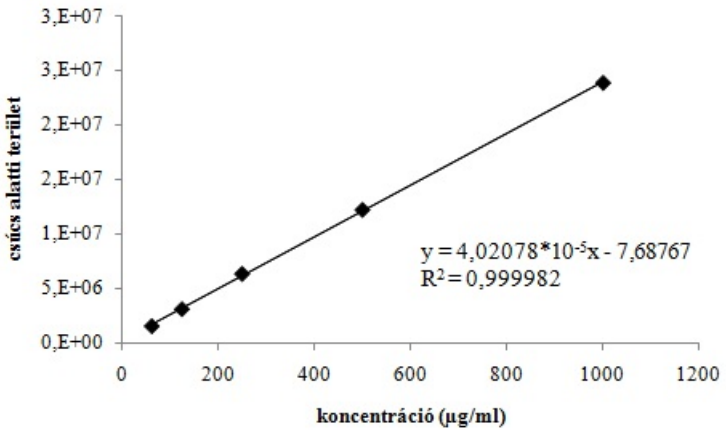
**12. Melléklet. Az OPA bomlásának vizsgálata során használt analitikai HPLC módszer rendszerpontosságának számításai.**

| | *6-e-OPA* | | *OPA* | | *OPI* | | *3-a-OPA* | | *3-a-6-e-OPA* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület |
| **1.** | 13,36 | 275074 | 14,39 | 321672 | 17,35 | 310357 | 19,98 | 724899 | 22,08 | 551780 |
| **2.** | 13,31 | 285872 | 14,34 | 344795 | 17,28 | 349527 | 19,91 | 759209 | 22,01 | 576936 |
| **3.** | 13,31 | 264313 | 14,34 | 309116 | 17,28 | 299173 | 19,91 | 698540 | 22,01 | 530222 |
| **Átlag** | 13,33 | 275086,33 | 14,36 | 325194,33 | 17,30 | 319685,67 | 19,93 | 727549,33 | 22,03 | 552979,33 |
| **SD** | 0,03 | 10779,51 | 0,03 | 18098,42 | 0,04 | 26441,43 | 0,04 | 30421,21 | 0,04 | 23380,08 |
| **RSD %** | **0,19** | **3,92** | **0,20** | **5,57** | **0,22** | **8,27** | **0,20** | **4,18** | **0,19** | **4,23** |
| **Elfogadási feltétel** | RSD <1% | RSD <10% | RSD <1% | RSD <10% | RSD <1% | RSD <10% | RSD <1% | RSD <10% | RSD <1% | RSD <10% |

**13. Melléklet. Az O1 sarzs tisztítása során alkalmazott analitikai HPLC módszer rendszeralkalmassági paraméterei.**

| | $t_R$ | $r_G$ | $k'$ | $R_S$ | $A_S$ | $W_h$ | $N$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **OPA** | 13,75 | 1,00 | 10,18 | 2,16 | 1,39 | 0,29 | 12127,40 |

**14. Melléklet. Az O1 sarzs frakcióinak ellenőrzésére használt analitikai HPLC módszer kalibrációs egyenese OPA-ra.**



**15. Az O1 sarzs félpreparatív tisztítása során alkalmazott kalibráció linearitásának ellenőrzése OPA esetén.**

| *csúcs alatti terület* | *számított koncentráció [µg/ml]* | *bemért koncentráció [µg/ml]* | *eltérés [%]* |
|---|---|---|---|
| **1514594** | 53,21 | 62,50 | -14,86 |
| **3080697** | 116,18 | 125,00 | -7,06 |
| **6318510** | 246,37 | 250,00 | -1,45 |
| **12196371** | 482,70 | 500,00 | -3,46 |
| **23848604** | 951,21 | 1000,00 | -4,88 |

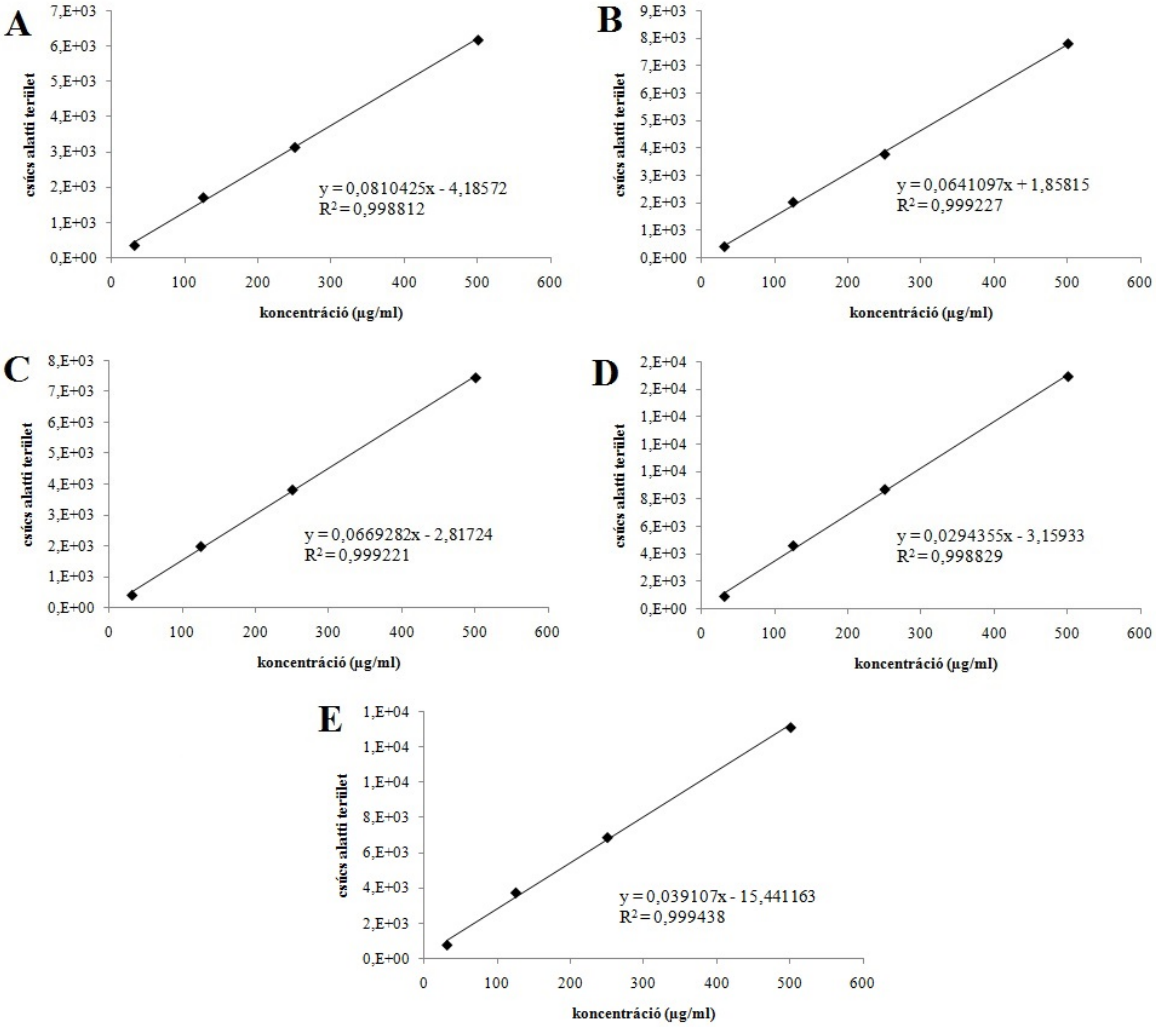
**16. Az O1 sarzs tisztítása során alkalmazott HPLC módszer rendszerpontossági számításai.**

| | ***OPA*** | |
|---|---|---|
| | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület |
| **1.** | 13,75 | 23297712 |
| **2.** | 13,75 | 24981102 |
| **3.** | 13,80 | 24305086 |
| **Átlag** | 13,77 | 24194633,33 |
| **SD** | 0,03 | 847112,93 |
| **RSD %** | **0,20** | **3,50** |
| **Elfogadási feltétel** | RSD <1% | RSD <10% |

**17. Melléklet. A O2, O3 és O4 sarzsok tisztítása során használt analitikai HPLC módszer rendszeralkalmassági paraméterei.**

| | $t_R$ | $r_G$ | $k'$ | $R_S$ | $A_S$ | $W_h$ | $N$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **6-e-OPA** | 8,43 | 0,92 | 4,73 | 22,59 | 0,82 | 0,18 | 10414 |
| **OPA** | 9,13 | 1,00 | 5,21 | 2,06 | 0,82 | 0,2 | 11000 |
| **OPI** | 10,55 | 1,16 | 6,18 | 3,81 | 0,84 | 0,23 | 11236 |
| **3-a-OPA** | 12,35 | 1,35 | 7,4 | 4,29 | 0,82 | 0,25 | 12482 |
| **3-a-6-e-OPA** | 13,82 | 1,51 | 8,4 | 3,17 | 0,78 | 0,28 | 13220 |

**18. Melléklet. A O2, O3 és O4 sarzsok tisztítása során, az egyes frakciók tisztaságának ellenőrzésére szolgáló analitikai HPLC módszer kalibrációs egyenesei: 6-OPA (A), OPA (B), OPI (C), 3-a-OPA (D) és 3-a-6-e-OPA (E).**



**19. Melléklet. Az O2, O3, O4 sarzsok félpreparatív tisztítása során alkalmazott kalibrációk linearitásának ellenőrzése.**

| *vegyület* | *csúcs alatti terület* | *számított koncentráció [µg/ml]* | *bemért koncentráció [µg/ml]* | *eltérés [%]* |
|---|---|---|---|---|
| **6-e-OPA** | 347 | 23,94 | 31,25 | -23,40 |
| | 1710 | 134,40 | 125,00 | 7,52 |
| | 3139 | 250,21 | 250,00 | 0,08 |
| | 6193 | 497,71 | 500,00 | -0,46 |
| **OPA** | 421 | 28,85 | 31,25 | -7,69 |
| | 2034 | 132,26 | 125,00 | 5,81 |
| | 3777 | 244,00 | 250,00 | -2,40 |
| | 7788 | 501,14 | 500,00 | 0,23 |
| **OPI** | 414 | 24,89 | 31,25 | -20,35 |
| | 1996 | 130,77 | 125,00 | 4,62 |
| | 3832 | 253,65 | 250,00 | 1,46 |
| | 7467 | 496,94 | 500,00 | -0,61 |
| **3-a-OPA** | 905 | 23,48 | 31,25 | -24,86 |
| | 4612 | 132,60 | 125,00 | 6,08 |
| | 8728 | 253,75 | 250,00 | 1,50 |
| | 16972 | 496,42 | 500,00 | -0,72 |
| **3-a-6-e-OPA** | 1055 | 25,82 | 31,25 | -17,39 |
| | 3722 | 130,12 | 125,00 | 4,09 |
| | 6859 | 252,79 | 250,00 | 1,12 |
| | 13117 | 497,53 | 500,00 | -0,49 |

**20. Melléklet. Az O2, O3 és O4 sarzsok tisztítása során használt analitikai HPLC módszer rendszerpontosságának számításai.**

| | *6-e-OPA* | | *OPA* | | *OPI* | | *3-a-OPA* | | *3-a-6-e-OPA* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület | $t_R$ (min) | csúcs alatti terület |
| **1.** | 8,53 | 1611 | 9,22 | 1975 | 10,70 | 1930 | 12,50 | 4451 | 13,95 | 3444 |
| **2.** | 8,43 | 1675 | 9,13 | 2040 | 10,55 | 2006 | 12,35 | 4541 | 13,82 | 3520 |
| **3.** | 8,42 | 1547 | 9,11 | 1923 | 10,53 | 1907 | 12,34 | 4327 | 13,80 | 3262 |
| **Átlag** | 8,46 | 1611,00 | 9,15 | 1979,33 | 10,59 | 1947,67 | 12,40 | 4439,67 | 13,85 | 3408,67 |
| **SD** | 0,06 | 64,00 | 0,06 | 58,62 | 0,09 | 51,81 | 0,09 | 107,45 | 0,08 | 132,58 |
| **RSD %** | **0,71** | **3,97** | **0,68** | **2,96** | **0,89** | **2,66** | **0,70** | **2,42** | **0,58** | **3,89** |
| **Elfogadási feltétel** | RSD <1% | RSD <10% | RSD <1% | RSD <10% | RSD <1% | RSD <10% | RSD <1% | RSD <10% | RSD <1% | RSD <10% |

## 21. Melléklet. A 6-e-OPA NMR adatai.

| atom | $^{13}C$ | $^{1}H$ | cosy | | hmbc C→H | | | | | noesy | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1α<br>1β | 42,5 | 1,38 m<br>1,74 m | 1β<br>1α | | | | | | | 22 | 23 | | | |
| 2 | 49,4 | 2,12 m | 6 | | 4β | 6 | | | | 4α | 22 | | | |
| 3 | 76,6 | - | | | 4 | 12β | 20 | | | | | | | |
| 4β<br>4α | 54,7 | 2,41 d (16,8)<br>3,05 d (16,8) | 4α<br>4β | | 20 | | | | | 4α<br>4β | <br>2 | <br>20 | | |
| 5 | 216,4 | - | | | 4 | 6 | | | | | | | | |
| 6 | 48,0 | 3,35 d (10,6) | 2 | | 2 | 4β | 8 | 21 | | 10 | 12β | | | |
| 7 | 142,4 | - | | | 2 | 6 | 9α | | | | | | | |
| 8 | 157,7 | 6,87 q (7,4) | 9 | | 6 | 9α | 21 | | | 9 | 21 | 22 | | |
| 9α<br>9β | 29,4 | 2,33 m<br>2,78 d (19,5) | 8<br>8 | 10<br>10 | 10 | | | | | 8<br>10 | 9β<br>9α | 15<br>15 | 22<br>12β | |
| 10 | 53,3 | 2,59 dd | 9 | | 1β | 8 | 9 | 12β | 22 | 6 | 9β | 12β | | |
| 11 | 41,5 | - | | | 10 | 12β | | | | | | | | |
| 12α<br>12β | 42,1 | 1,70 m<br>1,84 t (12,6) | 12β<br>12α | | 2 | 15 | 22 | | | 12β<br>6 | <br>9β | <br>10 | <br>15 | <br>12α |
| 13 | 31,0 | 1,70 m | 12β | | 1β | | | | | | | | | |
| 14 | 95,9 | - | | | 1β | 10 | 15 | 23 | | | | | | |
| 15 | 35,1 | 2,22 sxt (6,8) | 16 | 23 | 10 | 23 | | | | 9 | 12β | 23 | | |
| 16 | 41,9 | 1,78 m | 15 | 17 | 23 | | | | | | | | | |
| 17 | 71,9 | 4,61 q (7,3) | 16 | 18 | 15 | | | | | 18 | 24 | 25 | | |
| 18 | 126,7 | 5,14 d (8,6) | 17 | | | | | | | 17 | 24 | 25 | | |
| 19 | 134,7 | - | | | 17 | 24 | 25 | | | | | | | |
| 20 | 25,7 | 1,41 s | | | 4α | | | | | 4α | | | | |
| 21 | 194,0 | 9,21 s | | | 6 | 8 | | | | 8 | | | | |
| 22 | 22,8 | 0,85 s | | | 10 | 12β | | | | 1α | 2 | 9α | | |
| 23 | 16,0 | 1,04 d (6,9) | 15 | | 15 | | | | | 1α | 15 | | | |
| 24 | 18,1 | 1,67 s | | | | | | | | 17 | 18 | | | |
| 25 | 25,8 | 1,70 s | | | | | | | | 17 | 18 | | | |

## 22. Melléklet. Az OPA NMR adatai.

| atom | $^{13}C$ | $^{1}H$ | cosy | | | hmbc C→H | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | ? | 1,35 m<br>1,75 m | 1,75<br>1,35 | 2 | | | | | | |
| 2 | 49,80 | 2,44 m | 1 | 6 | | 1 | 4 | 20 | | |
| 3 | 76,0 | - | | | | 4 | 20 | | | |
| 4 | 53,5 | 2,5 d (19,0)<br>2,68 d<br>(19,0) | 2,68<br>2,5 | | | 20 | | | | |
| 5 | 219,0 | - | | | | 4 | 6 | | | |
| 6 | ? | 3,4 d (10,0) | 2 | | | | | | | |
| 7 | 142,5 | - | | | | 6 | 9 | | | |
| 8 | 160,6 | 7,17 t (8,3) | 2,37 | 2,43 | | 6 | 9 | 10 | | |
| 9 | ? | 2,37 m<br>2,43 m | 2,43<br>2,37 | 8<br>8 | 10<br>10 | | | | | |
| 10 | 61,0 | 1,68 m | 2,37 | 2,43 | | 9 | 12 | 22 | | |
| 11 | 35,5 | - | | | | 12 | 22 | | | |
| 12 | ? | 1,73 m<br>1,84 m | 1,84<br>1,73 | 2,14 | 1,58 | | | | | |
| 13 | ? | 1,58 m<br>2,14 m | 1,73<br>1,73 | 2,14<br>1,58 | | | | | | |
| 14 | 96,0 | - | | | | 9 | 12 | 13 | 16 | 23 |
| 15 | 36,9 | 2,25 m | 2,12 | 1,83 | 23 | 10 | 16 | 23 | | |
| 16 | 42,8 | 1,83 m<br>2,12 m | 2,25<br>2,25 | 17 | | 10 | 13 | 23 | | |
| 17 | 71,0 | 4,5 q (5,95) | 1,83 | 18 | | 16 | | | | |
| 18 | 125,9 | 5,19 d (8,4) | 17 | | | 16 | 25 | | | |
| 19 | 136,0 | - | | | | 25 | | | | |
| 20 | 24,7 | 1,32 s | | | | 1 | 4 | | | |
| 21 | 195,0 | 9,21 s | | | | 6 | 8 | | | |
| 22 | 16,4 | 0,89 s | | | | 1 | 10 | 12 | | |
| 23 | 16,5 | 1,1 d (7,2) | 15 | | | 16 | | | | |
| 24 | 24,5 | 1,74 s | | | | | | | | |
| 25 | 16,7 | 1,71 s | | | | | | | | |

## 23. Melléklet. AZ OPI NMR adatai.

| atom | $^{13}C$ | $^{1}H$ | cosy | | hmbc C→H | | | | noesy | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1α<br>1β | 46,9 | 1,29 m<br>1,92 m | 1β<br>1α | 2 | 6 | 9 | 13 | 22 | 6<br>9 | 9 | | | |
| 2 | 50,8 | 2,71 d (12,8) | 1α | 6 | 1α | 4 | 6 | 20 | 6 | 22 | | | |
| 3 | 180,6 | - | | | 4 | 20 | | | | | | | |
| 4 | 129,8 | 5,88 s | 20 | | 20 | | | | 20 | | | | |
| 5 | 209,7 | - | | | 4 | 6 | 20 | | | | | | |
| 6 | 52,3 | 3,58 d (2,5) | 2 | | 4 | 20 | 21a | | 1α | 2 | 9 | | |
| 7 | 134,3 | - | | | 6 | 20 | 21 | | | | | | |
| 8 | 130,3 | 5,72 d (4,6) | 9 | | 6 | 21 | | | 9 | 21 | | | |
| 9 | 53,2 | 2,45 m | 8 | | 8 | 12 | 22 | | 1 | 6 | 8 | 15 | 18 |
| 10 | 41,7 | 1,71 m | | | 9 | 12α | 15 | 22 | 18 | | | | |
| 11 | 27,7 | - | | | 9 | 22 | | | | | | | |
| 12α<br>12β | 30,4 | 1,53 m<br>1,68 m | 12β<br>12α | 13 | 12β | | | | 12β<br>12α | 17<br>13 | <br>15 | | |
| 13 | 41,2 | 1,35 m | 12 | | 1α | 12β | 13 | | 12β | 22 | 23 | | |
| 14 | 96,0 | - | | | 9 | 10 | 16 | 23 | | | | | |
| 15 | 34,8 | 2,17 sxt (6,6) | 16 | 23 | 9 | 10 | 16 | 23 | 9 | 12β | 22 | 23 | |
| 16 | 41,8 | 1,74 m | 15 | 17 | | | | | 17 | | | | |
| 17 | 71,5 | 4,52 q (7,2) | 16 | 18 | 15 | | | | 12α | 16 | 18 | 23 | 25 |
| 18 | 126,7 | 5,08 d (8,7) | 17 | | 10 | 16 | 25 | | 9 | 10 | 17 | 24 | |
| 19 | 134,2 | - | | | 17 | 25 | | | | | | | |
| 20 | 17,2 | 2,02 s | 4 | | | | | | 4 | | | | |
| 21a<br>21b | 66,9 | 3,85 d (12,0)<br>4,08 d (12,0) | 21b<br>21a | | 8 | | | | 8<br>21a | 21b | | | |
| 22 | 22,0 | 0,94 s | | | 1α | 9 | 12β | 13 | 2 | 13 | 15 | 24 | |
| 23 | 15,9 | 0,97 s | 15 | | 10 | 15 | 16 | | 13 | 15 | 17 | 24 | |
| 24 | 25,5 | 1,65 s | | | | | | | 18 | 22 | 23 | | |
| 25 | 17,7 | 1,60 s | | | 24 | | | | 17 | | | | |

## 24. A 3-a-OPA NMR adatai.

| atom | $^{13}C$ | $^{1}H$ | cosy | | | hmbc C→H | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 48 | 1,39 t (13,2)<br>2,07 dd (13,2;3,6) | 2,07<br>2 | <br>1,39 | | 1,77 | 22 | 2 | 10 | 6 | |
| 2 | 51,0 | 2,67 dd (13,2;3,6) | 1 | 6 | | | | | | | |
| 3 | 181,3 | - | | | | 20 | | | | | |
| 4 | 130,7 | 6,00 s | | | | 20 | | | | | |
| 5 | 210,7 | - | | | | 4 | 20 | 6 | | | |
| 6 | 50,2 | 3,42 d (3,7) | 2 | | | 1 | 8 | 21 | 6 | 20 | |
| 7 | 142,0 | - | | | | 6 | 9 | | | | |
| 8 | 157,6 | 6,98 dd (6,5;2,4) | 9 | | | 6 | 9 | | | | |
| 9 | 31,4 | 2,48 m<br>2,85 m | 10<br>8 | 8<br>2,48 | 2,85<br>10 | 13 | | | | | |
| 10 | 54,6 | 2,67 | 9 | 2,85 | | 1 | 8 | 2,48 | 13 | 22 | 12 |
| 11 | 43 | - | | | | | | | | | |
| 12 | 30,8 | 1,60 m<br>1,77 m | 1,77<br>1,60 | 1,47 | | | | | | | |
| 13 | 42,6 | 1,47 m<br>1,77 m | 1,77<br>1,60 | 1,60<br>1,47 | | 22 | 23 | 15 | 12 | 1 | |
| 14 | 98,0 | - | | | | 12 | 13 | 16 | 10 | 15 | |
| 15 | 36,5 | 2,34 sxt (6,9) | 23 | 16 | | 23 | 16 | 10 | | | |
| 16 | 42,9 | 1,84 m<br>1,86 m | 15<br>15 | 17<br>17 | | 10 | | | | | |
| 17 | 73,3 | 4,66 qva (7,2) | 18 | 16 | | 15 | 1,86 | | | | |
| 18 | 127,9 | 5,21 d (7,2) | 17 | | | 24 | 25 | 16 | | | |
| 19 | 136,3 | - | | | | 24 | 25 | | | | |
| 20 | 17,1 | 2,11 s | | | | | | | | | |
| 21 | 194,5 | 9,25 s | | | | 6 | 8 | | | | |
| 22 | 22,5 | 0,92 s | | | | 10 | 1,39 | 1,77 | | | |
| 23 | 16,4 | 1,08 d (6,95) | 15 | | | 16 | | | | | |
| 24 | 25,9 | 1,71 s | | | | 25 | | | | | |
| 25 | 18,1 | 1,68 s | | | | 24 | | | | | |

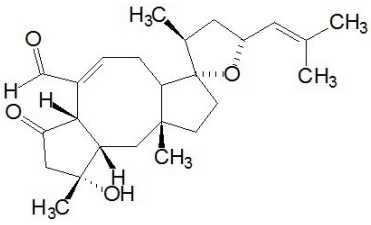
## 25. Melléklet. A 3-a-6-e-OPA NMR adatai.

| atom | $^{13}C$ | $^{1}H$ | cosy | | | hmbc C→H | | | | | noesy | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 26,4 | 1,72 m | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 48,2 | 3,15 t | 6 | | | 4 | 20 | 21 | | | 6 | 12α | 20 | 22 |
| 3 | 175,9 | - | | | | 20 | | | | | | | | |
| 4 | 131,4 | 6,13 s | 20 | | | 20 | | | | | 20 | | | |
| 5 | 203,4 | - | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 48,0 | 3,86 bs | 2 | | | 8 | | | | | 2 | | | |
| 7 | 139,2 | - | | | | 8 | 9α | | | | | | | |
| 8 | 158,6 | 7,07 dd (8,0;4,7) | 9 | | | 21 | 9α | | | | 9 | 21 | | |
| 9α<br>9β | 25,7 | 2,32 m<br>2,52 bd (8,0) | 8<br>8 | 9β<br>9α | | 8 | | | | | 8<br>8 | 9β<br>9α | <br>15 | |
| 10 | 42,7 | 1,70 m | | | | 15 | 23 | | | | 15 | | | |
| 11 | 44,1 | - | | | | 9α | 10 | 12 | 16α | 22 | | | | |
| 12α<br>12β | 30,7 | 1,52 m<br>1,84 m | 12β<br>12α | | | | | | | | 12β<br>12α | 23<br>16β | <br>22 | <br>23 |
| 13 | 36,4 | 1,52 m | 12β | | | 22 | | | | | | | | |
| 14 | 94,8 | - | | | | 13 | 16 | 23 | | | | | | |
| 15 | 36,6 | 2,12 m | 16 | 23 | | 16β | 23 | | | | 10 | 16β | 23 | |
| 16α<br>16β | 39,4 | 1,30 dd (11,4;7,6)<br>1,72 m | 16β<br>16α | 15<br>17 | 17 | | | | | | 12β<br>9β | 22<br>15 | | |
| 17 | 71,4 | 4,45 q (7,8) | 16 | 18 | | 15 | 16β | | | | 24 | 25 | | |
| 18 | 127,1 | 5,15 d (8,2) | 17 | | | | | | | | 24 | | | |
| 19 | 134,9 | - | | | | | | | | | | | | |
| 20 | 18,3 | 2,14 s | 4 | | | | | | | | 2 | 4 | | |
| 21 | 194,6 | 9,35 s | | | | 8 | | | | | 8 | | | |
| 22 | 22,7 | 0,75 s | | | | | | | | | 1 | 12β | 16α | 23 |
| 23 | 17,8 | 1,03 s | 15 | | | 15 | | | | | 10 | 12 | 15 | 22 |
| 24 | 26,4 | 1,71 s | | | | | | | | | 16α | 17 | 18 | |
| 25 | 18,5 | 1,64 s | | | | 18 | | | | | 17 | | | |

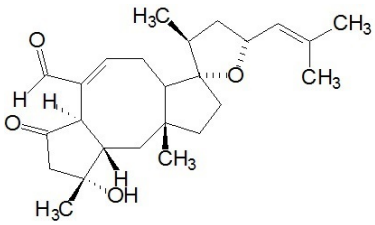
**26. Melléklet. Az ISM-08 NMR adatai.**

| atom | $^{13}C$ | $^{1}H$ |
|---|---|---|
| 1 | 36,63 | 1,55; 1,17 |
| 2 | 51,62 | 2,29 |
| 3 | 82,37 | - |
| 4 | 53,28 | 2,54; 1,81 |
| 5 | 73,33 | 4,85 |
| 6 | 51,76 | 3,08 |
| 7 | 143,72 | - |
| 8 | 160,4 | 6,98 |
| 9 | 24,26 | 2,4 |
| 10 | 62,19 | 1,64 |
| 11 | 43,76 | - |
| 12 | 42,33 | 1,66; 1,41 |
| 13 | 43,9 | 1,74 |
| 14 | 96,79 | - |
| 15 | 37,98 | 2,26 |
| 16 | 44,02 | 1,81; 1,74 |
| 17 | 72,48 | 4,49 |
| 18 | 126,83 | 5,18 |
| 19 | 136,97 | - |
| 20 | 26,95 | 1,22 |
| 21 | 198,53 | 9,29 |
| 22 | 17,98 | 0,91 |
| 23 | 17,98 | 1,1 |
| 24 | 18,26 | 1,7 |
| 25 | 25,97 | 1,74 |

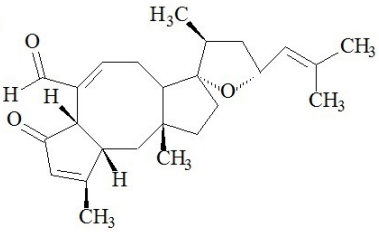
## 27. Melléklet. Az ophiobolinok szerkezeti képletei.



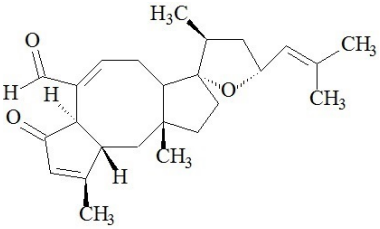
**Ophiobolin A**



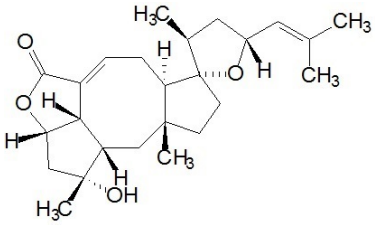
**6-*epi*-ophiobolin A**



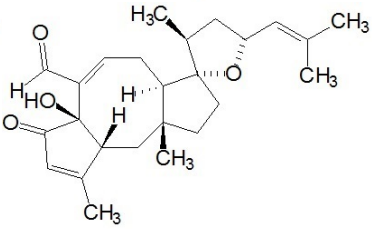
**3-anhidro-ophiobolin A**



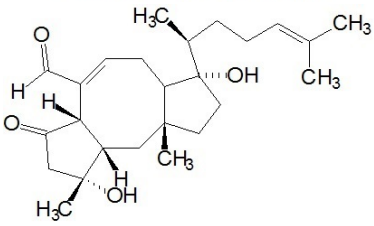
**3-anhidro-6-*epi*-ophiobolin A**



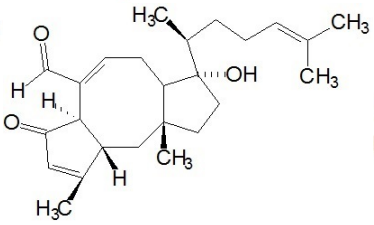
**Ophiobolin A lakton**



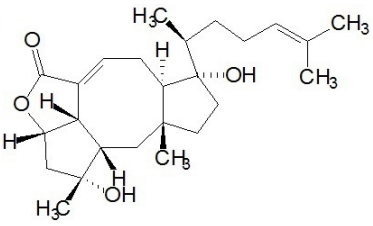
**3-anhidro-6-hidroxi-ophiobolin A**



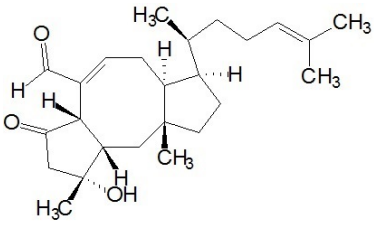
**Ophiobolin B**



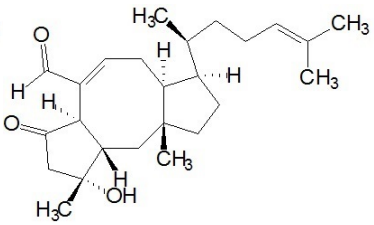
**3-anhidro-6-*epi*-ophiobolin B**



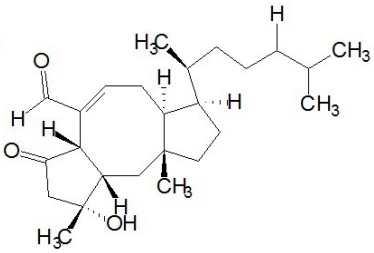
**Ophiobolin B lakton**



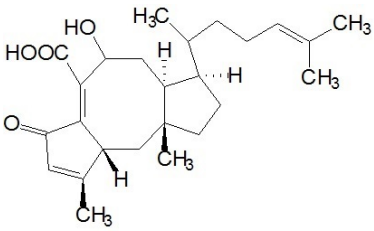
**Ophiobolin C**



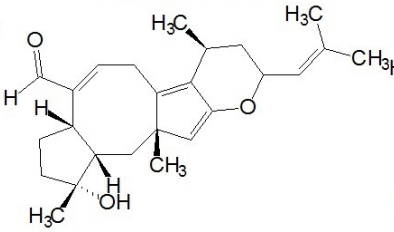
**6-*epi*-ophiobolin C**



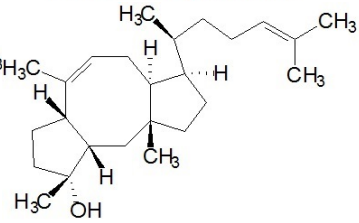
**18,19-dihidro-ophiobolin C**



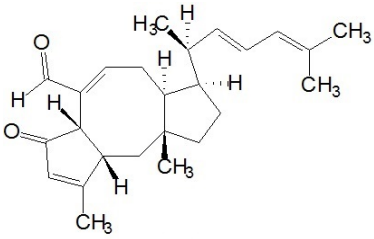
**Ophiobolin D**



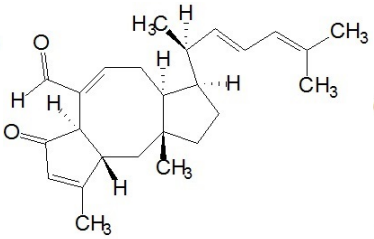
**Ophiobolin E**



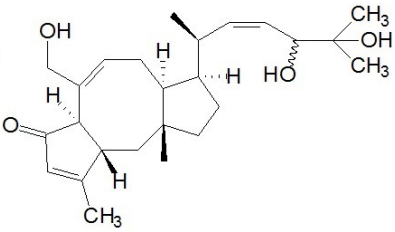
**Ophiobolin F**



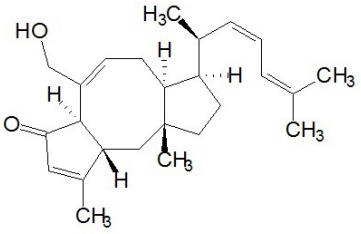
**Ophiobolin G**



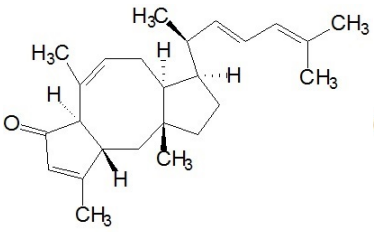
**6-*epi*-ophiobolin G**



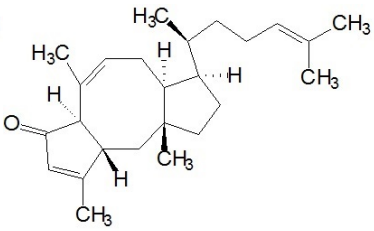
**(6a)-18,19,21,21-O-tetrahidro-18,19-dihidroxi-ophiobolin G**



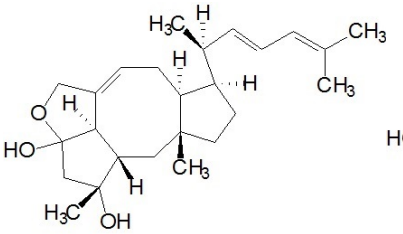
**6a-21,21-O-hihidro-ophiobolin G**



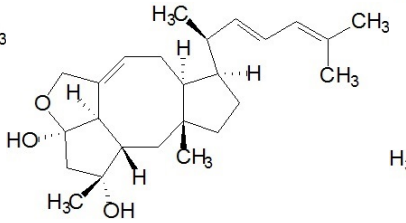
**6-*epi*-21-dezoxi-ophiobolin G**



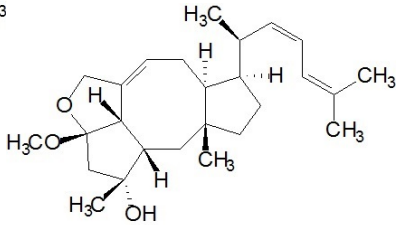
**6-epi-16,17-dihidro-21-dezoxi-ophiobolin G**



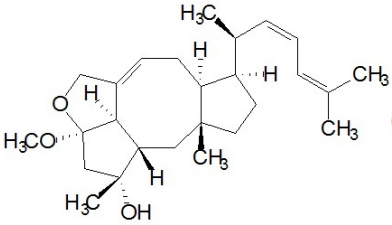
**Ophiobolin H**



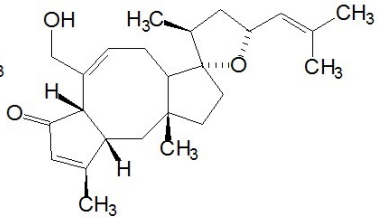
**5a,6a-ophiobolin H**



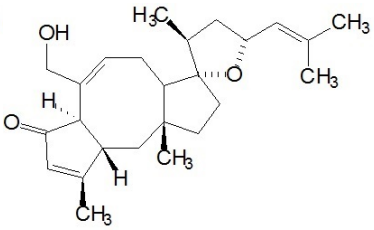
**5-O-metil-ophiobolin H**



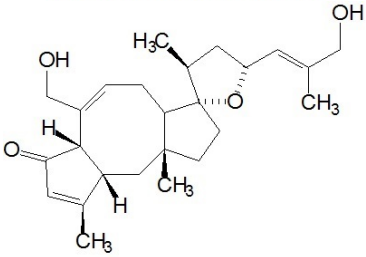
**(5a,6a)-5-O-metil-ophiobolin H**



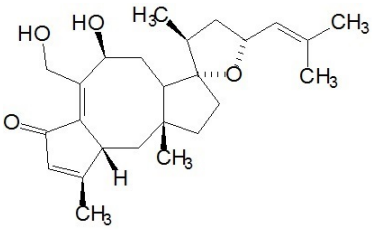
**Ophiobolin I**



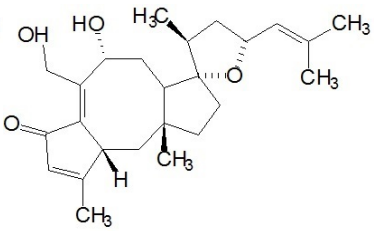
**6-*epi*-ophiobolin I**



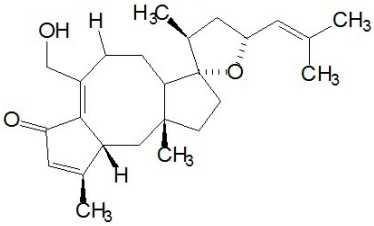
**25-hidroxi-ophiobolin I**



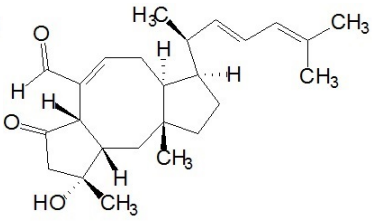
**Ophiobolin J**



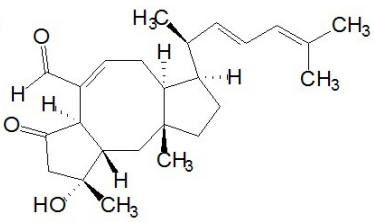
**8-*epi*-ophiobolin J**



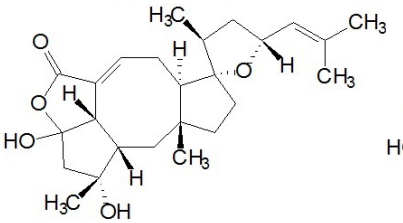
**8-dezoxi-ophiobolin J**



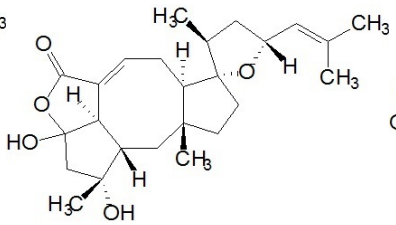
**Ophiobolin K**



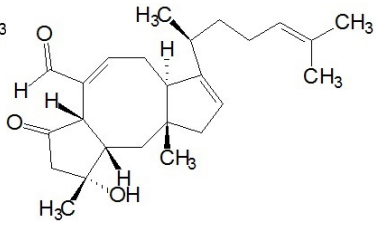
**6-*epi*-ophiobolin K**



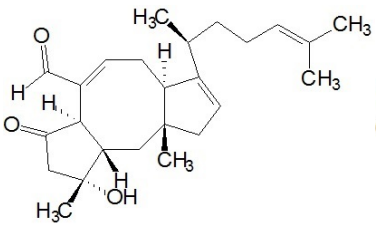
**Ophiobolin L**



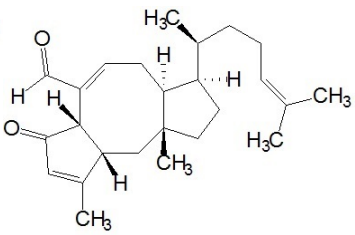
**6-*epi*-ophiobolin L**



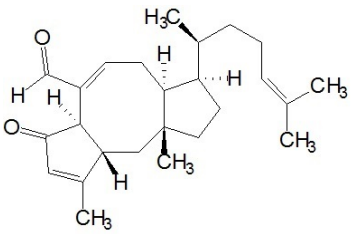
**Ophiobolin M**



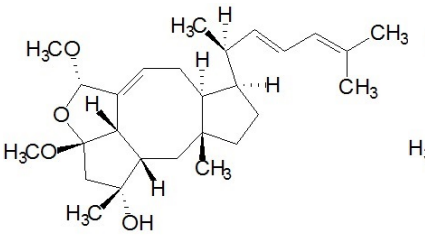
**6-*epi*-ophiobolin M**



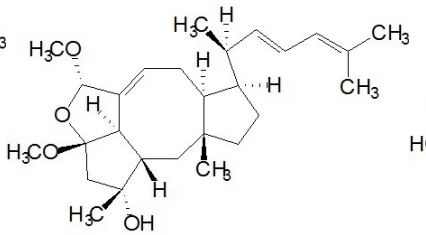
**Ophiobolin N**



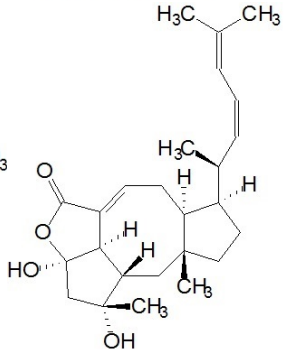
**6-*epi*-ophiobolin N**



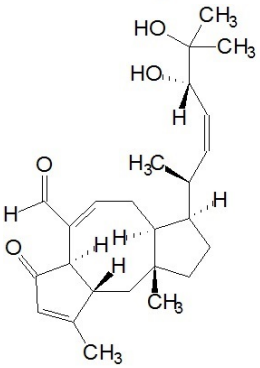
**Ophiobolin O**



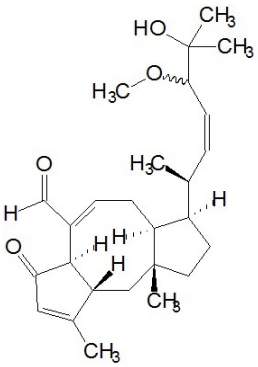
**6-*epi*-ophiobolin O**



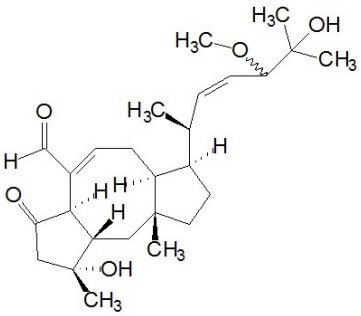
**Ophiobolin P**



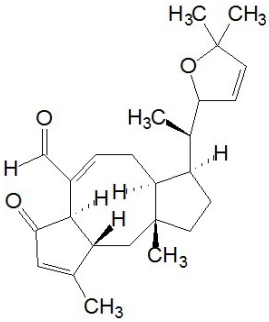
**Ophiobolin Q**



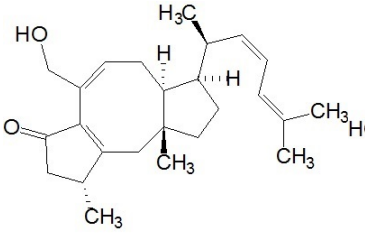
**Ophiobolin R**



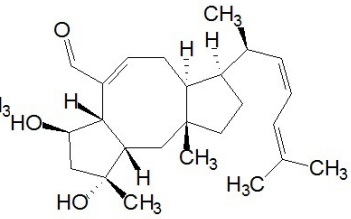
**Ophiobolin S**



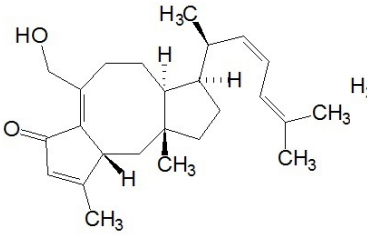
**Ophiobolin T**



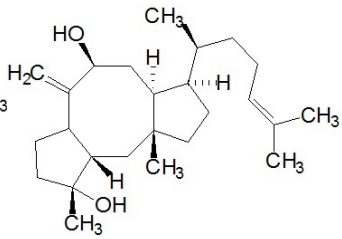
**Ophiobolin U**



**Ophiobolin U***



**Ophiobolin V**



**Ophiobolin W**