

***Juncus* fajok fenantrénjeinek izolálása és szerkezetmeghatározása**

Doktori értekezés tézisei

Dr. Stefkó Dóra

Szegedi Tudományegyetem

Farmakognóziai Intézet

Szeged

2023

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Farmakognózia PhD Program
Programvezető: Prof. Hohmann Judit DSc

Farmakognóziai Intézet

Témavezető:

Vasas Andrea PhD

***Juncus* fajok fenantrénjeinek izolálása és szerkezetmeghatározása**

Doktori értekezés tézisei

Dr. Stefkó Dóra

Szigorlati Bizottság:

Elnök: Prof. Hohmann Judit DSc
Tagok: Csupor Dezső DSc, Janicsák Gábor CSc

Bíráló Bizottság:

Elnök: Prof. Ilisz István DSc
Opponensek: Alberti Ágnes PhD, Horváth Györgyi PhD
Tagok: Berkó Szilvia PhD, Kanizsainé Minorics Renáta PhD

Szeged, Hungary

2023

BEVEZETÉS

Napjainkban a daganatos betegségek a halálozások okai között kiemelten magas gyakorisággal szerepelnek, a tumorterápiában alkalmazható gyógyszerek kifejlesztése ezért a gyógyszerkutatások egyik kiemelt területe. A kutatások motivációs tényezője továbbá, hogy számos ma használatos gyógyszerrel szemben a tumorsejtek rezisztenciája alakul ki, illetve a szerek mellékhatásai miatt az alkalmazható dózis korlátozott.

A növényi és egyéb természetes eredetű vegyületek a gyógyszerkutatásban napjainkban is jelentős szerepet kapnak, alapul szolgálhatnak új, hatásos gyógyszermolekulák kifejlesztéséhez. A modern gyógyszervegyületek jelentős része ma is természetes eredetű, vagy természetes vegyületekkel rokon. Az újonnan kifejlesztett vegyületek előnye lehet a jobb biztonságosság, továbbá modellvegyületekként szolgálhatnak a szintetikus kémikusok és a farmakológusok számára. A hatásos tumorelles szerek elsősorban az angiogenezis és a rákos sejtek proliferációjának gátlása, valamint apoptózis indukálása révén fejtik ki hatásukat. A növényi szerek esetén általánosan elmondható, hogy gyulladáscsökkentő hatásuk révén gátolják a tumor terjedését és kaspázfüggő mechanizmusokon keresztül vagy intracelluláris oxidatív stressz indukálásával serkentik az apoptózist. Ezen kívül a természetes anyagok számos kulcsfontosságú szabályozó mechanizmust befolyásolhatnak. Sok vegyület esetén már azonosították a molekuláris célpont(ka)t és a hatásmechanizmust, és szerkezetmódosítással próbálják a hatást fokozni. A természetes anyagok hatékonysága és biohasznosulása tovább növelhető különböző formulálási technikák alkalmazásával, amelyek közül kiemelhetőek a nanoemulzió, nanorészecske, liposzóma és a filmalapú gyógyszerformák. Ilyen kísérletek történtek például a berberinnel, kurkuminnal, rezveratrollal, kamptotecinnel és a celasztrollal.

A természetes alapú gyógyszerfejlesztések mellett emelkedő tendenciát mutat a természetes eredetű szerekkel végzett kombinációs kezelések aránya is, amelynek célja elsősorban a tumornövekedés megakadályozása, illetve használatukkal magasabb terápiás hatékonyság érhető el.

A természetes kismolekulák egyik ígéretes csoportját a fenantrének alkotják. A fenantrének figyelemre méltó farmakológiai aktivitással (pl. antiproliferatív, gyulladásgátló és antimikrobiális) rendelkeznek. A Juncaceae fenantrének közül a dehidroeffuzol, a junkuzol és a junkuenin B emelhető ki, amelyek antiproliferatív hatását különböző humán eredetű tumoros sejtvonalak ellen igazolták.

A Szegedi Tudományegyetem Farmakognózi Intézetében 2014-ben indult kutatási program keretében a Juncaceae fajok speciális metabolitjainak vizsgálatát tűzték ki célul. A program keretében a szittyófélek fitokémiai és farmakológiai vizsgálatát, biológiailag aktív vegyületek izolálását és a legígéretesebb vegyületek félszintetikus átalakítását végzik. Napjainkig több mint 20 faj szűrővizsgálatát végezték el és biológiailag aktív vegyületeket izoláltak a *Juncus compressus*ból, *J.*

inflexusból, *J. tenuis*ből és a *Luzula luzuloides*ből és félszintetikus származékokat állítottak elő a junkuenin B-ből, a junkuzolból és az effuzolból.

CÉLKITŰZÉSEK

A Juncaceae növény család fajai a fenantrén típusú vegyületek gazdag forrásai. A Szegedi Tudományegyetem Farmakognóziai Intézetében indult kutatási program célja a szittyófélék speciális metabolitjainak vizsgálata, elsősorban fenantrének izolálása és szerkezetmeghatározása, valamint a vegyületek farmakológiai vizsgálata, amelynek érdekében a következő feladatokat végeztük el:

- A növényi nyersanyag begyűjtése (4 növényfaj) a preparatív munkához szükséges mennyiségben.
- Kivonatok előállítása, frakcionálása.
- *A Juncus atratus*, *J. gerardii*, *J. maritimus* és a *J. ensifolius* vegyületeinek izolálása különböző kromatográfiás módszerek kombinálásával.
- Az izolált vegyületek szerkezetmeghatározása spektroszkópai módszerek (1D és 2D NMR, HR-MS) segítségével.
- A vegyületek antiproliferatív hatásának vizsgálata különböző teszterendszerekben.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A növényi nyersanyagot Magyarország (*J. atratus*, *J. gerardii*) és Horvátország (*J. maritimus*) különböző területeiről gyűjtöttük 2015 és 2019 között. A *J. ensifolius* hazai kertészetből vásároltuk. A szobahőmérsékleten szárított növényi részeket metanollal perkoláltuk, majd az így nyert kivonatokat betöményítettük. 50%-os metanol hozzáadását követően folyadék–folyadék megosztást végeztünk *n*-hexánnal, kloroformmal/diklórometánnal és etil-acetáttal. A vegyületeket többlépcsős kromatográfiás eljárással tisztítottuk, oszlopkromatográfia (OCC), vákuum folyadékkromatográfia (VLC), közepes nyomású folyadékkromatográfia (MPLC), preparatív rétegekromatográfia (PLC), gélszűrés (GF) és nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) alkalmazásával. Állófázisként normál (NP) és fordított fázisú (RP) szilikagélt, poliamidot és Sephadex LH-20 gélt használtunk.

Az izolált vegyületek szerkezet-meghatározása UV-spektroszkópia, nagy felbontású tömegspektroszkópia (HR-MS), valamint mágneses magrezonancia-spektroszkópia (NMR) segítségével történt.

A vegyületek antiproliferatív hatásának vizsgálata az SZTE Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézetében és az SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézetében történt humán eredetű tumoros [emlő (MDA-MB-231, 4T1, MDA-MB-231, MCF-7, KCR és HTM-26), méhnyak (HeLa, SiHa) petefészek (A2780, A2780cis), vastagbél (COLO 205, COLO 320)] és normál [D3 (agyi endotél) és MCR-

5 (embrionális tüdő fibroblaszt)] sejtvonalakon MTT módszerrel. Pozitív kontrollként ciszplatint és doxorubicint használtunk. A szinergizmus vizsgálat során a vegyületeket doxorubicinnel kombinációban teszteltük HeLa sejtvonalon.

EREDMÉNYEK

A vegyületek izolálása

A növényi nyersanyagok extrakcióját szárítást és aprítást követően metanollal, szobahőmérsékleten, perkolátorban végeztük, majd folyadék-folyadék megosztással (*n*-hexán, kloroform/diklórmetán, etil-acetát) polaritás szerint frakcionáltuk a kivonatok komponenseit. A szerves fázisokat ezt követően különböző kromatográfiás módszerek alkalmazásával tisztítottuk, így jutottunk a tiszta vegyületekhez.

A *Juncus atratus* vegyületeinek izolálása

A *J. atratus* (fekete szittyó) diklórmetános fázisát poliamid oszlopon MeOH–H₂O [1:1, 2:1 (I. és II. frakció)] elegyével frakcionáltuk. A fenantrének a II. frakcióban dúsultak fel, ezért ezt a frakciót a továbbiakban normál fázisú vákuum folyadék kromatográfiával (NP-VLC) tisztítottuk ciklohexán–EtOAc–MeOH grádiens elúciót alkalmazva. Mivel az így nyert 15 fő frakció (II/1–15) még nagyon összetettnek bizonyult, a komponensek kinyeréséhez a továbbiakban még szelektívebb módszereket, köztük RP-VLC-t, NP-PLC-t, gélszűrést és RP-HPLC-t használtunk. Az elválasztástechnikai lépések eredményeként a növényből 9 vegyületet izoláltunk (1–9) (1. ábra).

A *Juncus gerardii* vegyületeinek izolálása

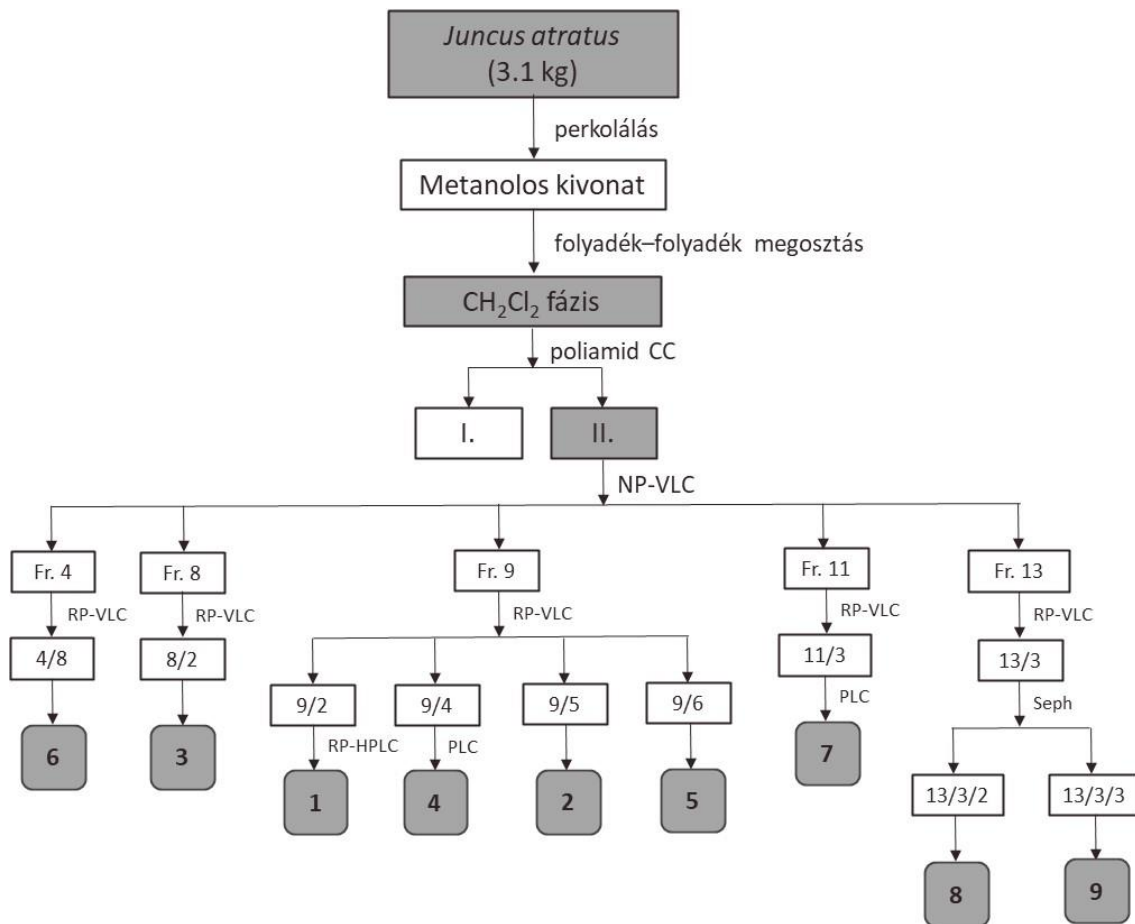
A *J. gerardii* (sziki szittyó) kloroformos fázisát poliamid oszlopon frakcionáltuk MeOH–H₂O [2:3 (A), 3:2 (B), and 2:1 (C, D, E)] grádiens elúciót alkalmazva. A B és D frakciókat VLC-vel tisztítottuk tovább szilikagél állófázison, ciklohexán–EtOAc–MeOH növekvő polaritású elegyeivel végezve az elválasztást. A B frakció esetén 16 (B/1–16), a D esetén pedig 6 (D/1–6) főfrakcióhoz jutottunk. Az etil-acetátos frakciót (F) szintén VLC-vel tisztítottuk, mozgófázisként CHCl₃–MeOH eluens rendszert használtunk és 15 főfrakciót (F/1–15) nyertünk. A továbbiakban RP-MPLC, GF, NP-PLC, RP-PLC, NP-HPLC és RP-HPLC módszerek alkalmazásával 23 komponenst izoláltunk (4–7, 10–21, 22–31) a növényből (2. ábra).

A *Juncus maritimus* vegyületeinek izolálása

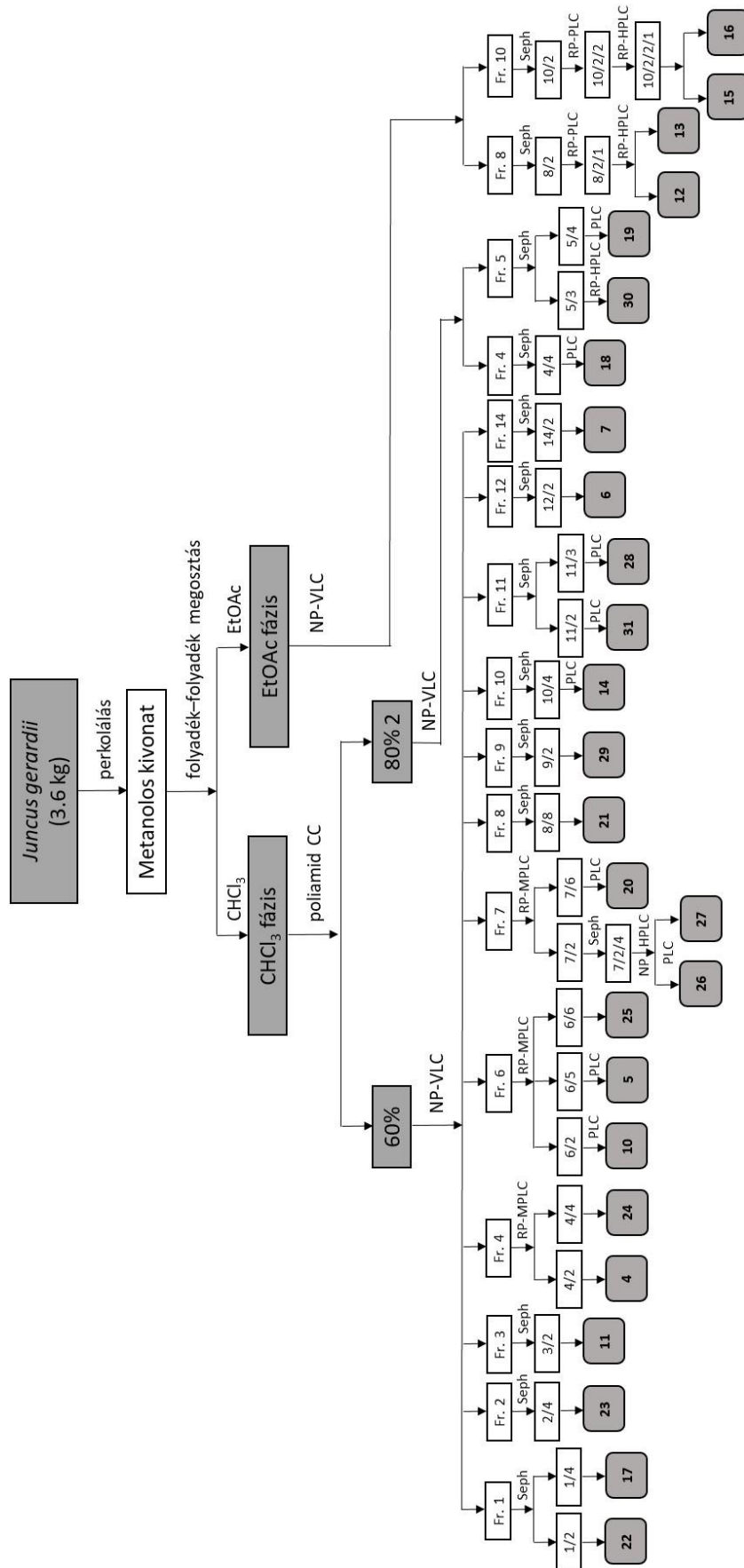
Perkolálást és folyadék-folyadék megosztást követően a *J. maritimus* (tengeri szittyó) kloroformos fázisát VLC-vel tisztítottuk szilikagél állófázison ciklohexán–EtOAc–MeOH grádiens rendszerrel. Az elválasztás 14 főfrakciót (1–14) eredményezett. A frakciókat ezt követően először gélkromatográfiával Sephadex LH-20 gélen, CH₂Cl₂–MeOH (1:1) arányú elegyével, majd RP-MPLC, NP-HPLC, RP-HPLC és NP-PLC segítségével tisztítottuk és végül 11 vegyületet izoláltunk (4, 24, 26, 30, 32–38) (3. ábra).

A *Juncus ensifolius* vegyületeinek izolálása

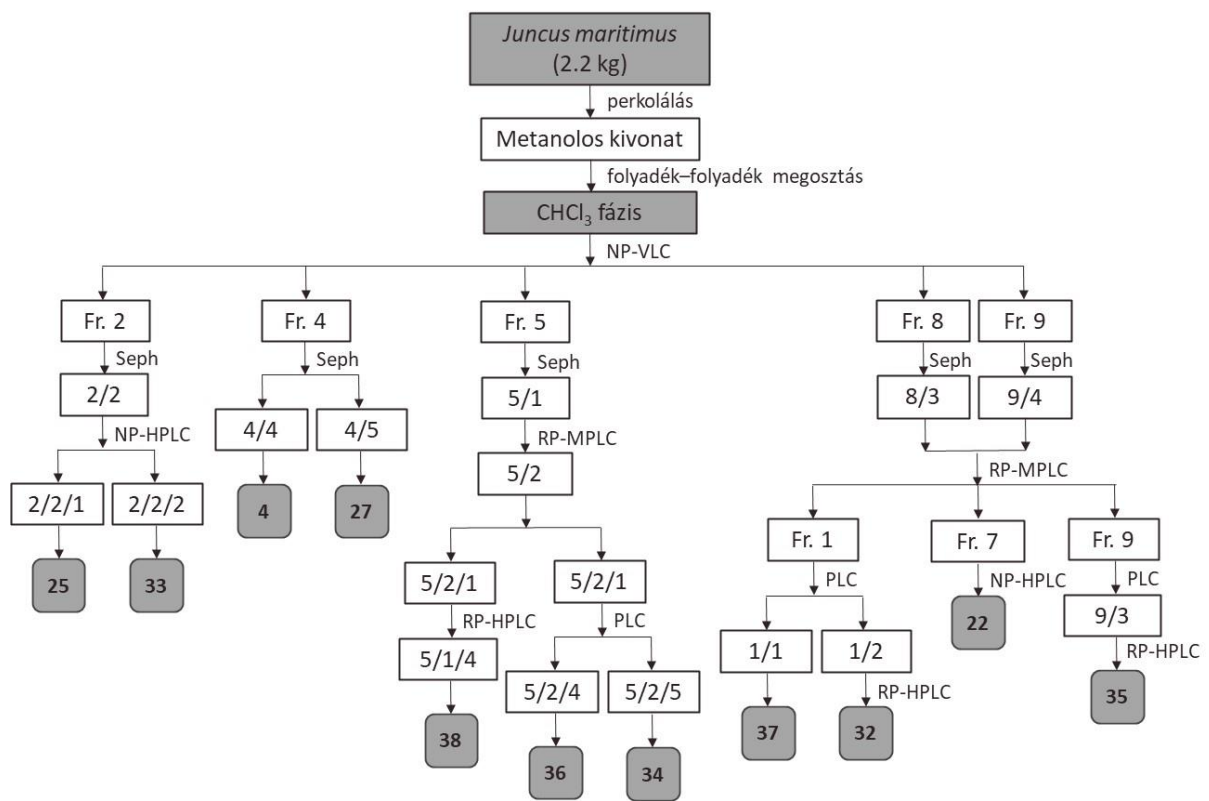
A *J. ensifolius* (kardlevelű szittyó) kloroformos frakcióját NP-VLC-vel választottuk el ciklohexán–EtOAc–MeOH grádiens elúciót alkalmazva, így 14 főfrakcióhoz (1–14) jutottunk. A következő lépésben valamennyi frakciót gélkromatográfiával tisztítottuk Sephadex LH-20 gélen CH₂Cl₂–MeOH (1:1) mozgófázissal. A továbbiakban RP-MPLC and RP-HPLC segítségével 19 vegyülethez (2, 3, 7, 17, 39–53) jutottunk (4. ábra).



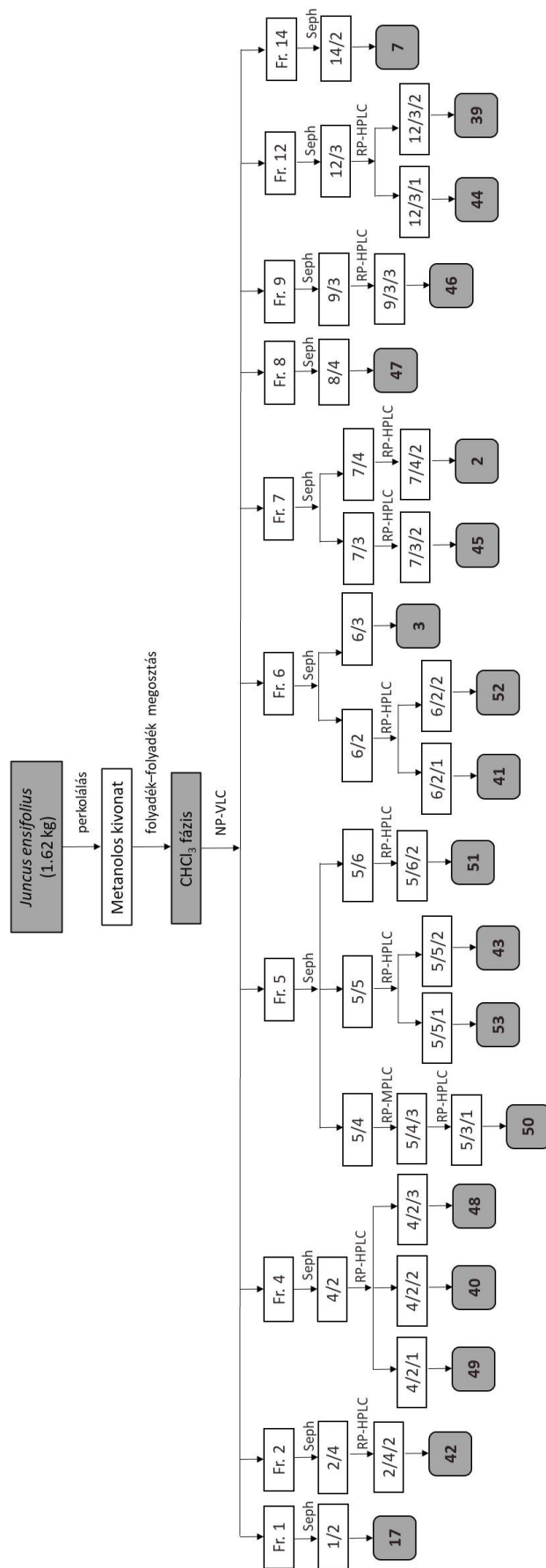
1. ábra. A *J. atratus* vegyületeinek izolálása



2. ábra. *A. J. gerardii* vegyületeinek izolálása



3. ábra. A *J. maritimus* vegyületeinek izolálása



4. ábra. A *J. ensifolius* vegyületeinek izolálása

Az izolált vegyületek szerkezetmeghatározása

Az izolált vegyületek szerkezet-meghatározása különböző spektroszkópai módszerek segítségével, valamint irodalmi adatokkal végzett összevetéssel történt. Tömegspektroszkópiás vizsgálatokkal meghatároztuk a molekulatömeget és az összegképletet, UV spektroszkópai és optikai forgatóképesség mérésekkel pedig további fontos információkat nyertünk. A szerkezet-meghatározáshoz az 1D és 2D NMR spektroszkópia szolgáltatta a legértékesebb adatokat. Az ^1H NMR, JMOD, ^1H – ^1H COSY, HSQC és HMBC spektrumok alapján levezettük a vegyületek síkbeli szerkezetét, majd a NOESY korrelációk segítségével meghatároztuk a molekulák relatív konfigurációját. Az NMR vizsgálatok eredményeként elkészítettük az új vegyületek és néhány ismert vegyület jellemzésére szolgáló teljes ^1H és ^{13}C NMR jelhozzárendelést. A királis anyagok esetén először meghatároztuk a vegyületek optikai forgatóképességét. Ezt követően királis HPLC elválasztásra került sor.

A négy vizsgált növény (*J. atratus*, *J. gerardii*, *J. maritimus* és *J. ensifolius*) vegyületei

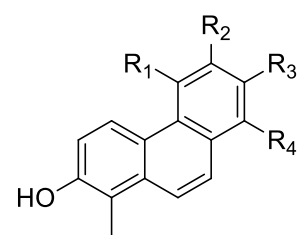
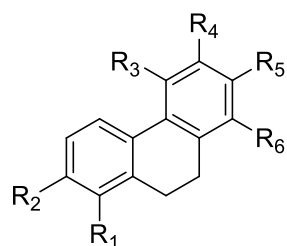
A *J. atratus* diklórmetános frakciójából kilenc vegyületet (1–9) nyertünk, amelyek közül öt fenantrén típusú (5a–c. ábra). Két vegyület, a junkatrin A (1) és B (2) a C-8 helyzetben acetyl-, illetve acetilén csoporttal szubsztituált új természetes anyag. A junkuenin B (3) esetén ebben a pozícióban vinilcsoport található. A 2 vegyület különlegessége, hogy ez az első természetes forrásból izolált acetilén-subsztituált fenantrén. Az izolált mennyiség alapján elmondható, hogy a növény fő fenantrén komponense a junkuenin B (3), amelyből több mint 100 mg-ot nyertünk. A junkatrin A (1) és B (2) feltehetően a junkuenin B-ből keletkezik a bioszintézis során. Ezekon kívül két további fenantrént, a dehidroeffuzolt (5) és 9,10-dihidroszármazékát, az effuzolt (4), valamint két flavont, az apigenint (6) és a luteolint (7), az aciklikus diterpén fitolt (8) és 13(R)-hidroxioktadeka-(9Z,11E,15Z)-triénsavat (9) azonosítottunk. Valamennyi vegyületet elsőként izoláltuk a *J. atratus*ból.

A *J. gerardii* vegyületeinek szerkezetmeghatározása során megállapítottuk, hogy 23 komponens fenantrén, amelyek közül 12, a gerardiin A–L (10–21) sorozat tagjai, új természetes anyagok (5a–c. ábra). A gerardiin A (10) és B (11) C-1 (10) illetve C-7 (11) helyzetben metoximetilén csoporttal szubsztituált. A 10 jelzésű vegyület szerkezete nagyon hasonló az effuzoléhoz (4), az egyetlen különbség a metoxicsoport jelenléte C-11 helyzetben. A gerardiin C (12) és D (13) az effuzol glükozidjai, amelyekben a glükóz molekula C-2 (12) vagy C-7 (13) helyzetben kapcsolódik a vázhoz glikozidikus kötéssel. A gerardiin F (15) és G (16) szintén glükózt tartalmaznak C-2 (15), illetve C-7 (16) helyzetben, azonban C-5 helyzetben a vinilcsoport helyett egy hidroxietil-csoport található a molekulában. Hasonlóképpen, a gerardiin E (14) is hidroxietil-csoporttal szubsztituált a C-5-ön. Az egyetlen különbség a gerardiin H (17) és a *J. maritimus*ból és más *Juncus* fajokból (*J. acutus*, *J. effusus*, *J. roemerianus*, *J. subulatus*) izolált junkunol (36) között az, hogy a 17-ben egy telítetlen B gyűrű található.

A difenantrének a speciális metabolitok egy ritka csoportját alkotják, napjainkig kevesebb mint 20 ilyen vegyületet írtak le a Juncaceae család fajaiból. A gerardiin I (18) és J (19) esetén két effuzol (4) monomer kapcsolódik össze vinilcsoportjaikon keresztül. A gerardiin K-nál (20) a két effuzol (4) molekula egy éterkötésen keresztül, míg a gerardiin L (21) esetén egy effuzol (4) és egy dehidroeffuzol (5) egység C–C kötést alkotva C-8–C-8' helyzetben kapcsolódik egymáshoz (5b. ábra). A dimereket felépítő monomereket, az effuzolt (4) és a dehidroeffuzolt (5) szintén izoláltuk a növényből.

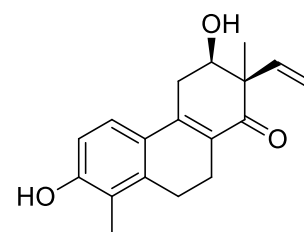
A *J. maritimus* fitokémiai vizsgálatának eredményeként 11 fenantrént, köztük négy új anyagot [maritin A–D (32–35)] azonosítottunk (5a–c. ábra). A vegyületek hidroxil-, metil-, aldehid-, hidroximetil-, metoxietil- és vinilcsoportokkal szubsztituáltak. A maritin C (34) a bioszintézis során valószínűleg dehidrojunkuzolból keletkezik a vinilcsoport kettőskötésének módosulásával, majd ezt követő gyűrűzáródással a C-4 és C-13 szénatomok között, ezzel egy ritka 4,5-etanofenantrén vázat eredményezve. A difenantrén maritin D (35) esetén két effuzol (4) monomer kapcsolódik egymáshoz C-2–C-3' helyzetben egy éterkötésen keresztül egy ritka diaril-éter szerkezetet alkotva. Az új természetes anyagokon kívül hét ismert fenantrént [effuzol (4), junkuzol (24), 2,7-dihidroxil-5-formil-1-metil-9,10-dihidrofenantrén (26), junkunol (36), 2,7-dihidroxil-1,8-dimetil-5-vinil-9,10-dihidrofenantrén (37), jinflexin A (38) és a dimer effuzuzin A (30)] is azonosítottunk a növény kivonatából. Az effuzol (4) kivételével valamennyi anyagot elsőként azonosítottunk a növényben.

Végül 19 vegyületet, köztük 17 fenantrént izoláltunk a *J. ensifolius* metanolos kivonatából (5a–c. ábra). 13 fenantrént, az enzifolin A–M (39–51) sorozat tagjait, elsőként azonosítottuk természetes forrásból. Az enzifolin A (39) és B (40) szerkezetileg egyedülállóak, mivel a fenantrén egységhez első esetben a flavonoid luteolin (7), második esetben pedig egy benzaldehid (53) egység kapcsolódik. A 41 jelzésű vegyület egy ritka 10-hidroxifenantrén. Hasonló vegyületet korábban csak a *Luzula sylvaticá*ból írtak le. Az enzifolin D (42) a szilvaticin A (52) 11-metoxi származéka, ez utóbbit szintén izolálták az említett *Luzula* fajból. A gerardiin H (17) mind a 42, mind az 52 jelzésű vegyület biogenetikai prekursorának tekinthető. A *J. ensifolius*ból izolált dimerek többnyire a növényből szintén azonosított monomerekből származtathatók; pl. az enzifolin J (48) és L (50) esetén két enzifolin E (43) egység kapcsolódik egymáshoz C-3–C-3' (48) vagy C-6–C-3' (50) helyzetben szimmetrikus vagy nem szimmetrikus dimert alkotva. Az enzifolin M-nél (51) két junkatrin B (2) monomer kapcsolódik C-3 atomjaikon keresztül szimmetrikus molekulát hozva létre. Végül az enzifolin K (49) esetén az enzifolin E (43) egy dehidrojunkuenin B-vel alkot dimert C-5–C-3' kapcsolódással. Az új vegyületeken kívül négy ismert fenantrént [junkatrin B (2), junkuenin B (3), gerardiin H (17) és szilvaticin A (52)], 4-hidroxibenzaldehidet (53) és luteolint (7) izoláltunk a növényből. Mindegyik vegyületet elsőként azonosítottuk a *J. ensifolius*ból.

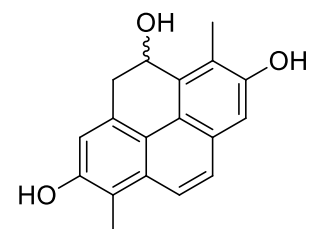


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
1	CH ₃	OH	H	OH	CH ₃	COCH ₃
2	CH ₃	OH	H	OH	CH ₃	CCH
3	CH ₃	OH	H	OH	CH ₃	CHCH ₂
4	CH ₃	OH	CHCH ₂	H	OH	H
10	CH ₂ OCH ₃	OH	CHCH ₂	H	OH	H
11	CH ₃	OH	H	H	CH ₂ OCH ₃	CHCH ₂
12	CH ₃	O-glc	CHCH ₂	H	OH	H
13	CH ₃	OH	CHCH ₂	H	O-glc	H
14	CH ₃	OH	CH(CH ₃)OH	H	OH	H
15	CH ₃	O-glc	CH(CH ₃)OH	H	OH	H
16	CH ₃	OH	CH(CH ₃)OH	H	O-glc	H
22	CH ₃	OCH ₃	CHCH ₂	CH ₃	OH	H
23	CH ₃	OCH ₃	CHCH ₂	H	OH	H
24	CH ₃	OH	CHCH ₂	CH ₃	OH	H
25	CH ₃	OH	CHCH ₂	H	CH ₂ OH	H
26	CH ₃	OH	CHO	H	OH	H
27	CH ₃	OH	CH(CH ₃)OCH ₃	H	OH	H
28	CH ₃	OH	CH ₂ OH	H	OH	H
32	CH ₃	OH	CHCH ₂	H	OH	CH ₂ OH
33	CH ₃	OH	H	H	CH ₃	CHCH ₂
36	CH ₃	OH	H	CH ₃	CHCH ₂	H
37	CH ₃	OH	CHCH ₂	H	OH	CH ₃
38	CH ₃	OH	CH(CH ₃)OCH ₃	H	OH	H
42	CH ₂ OCH ₃	OH	CHCH ₂	H	CH ₃	H
43	CH ₃	OH	OH	H	CH ₃	CHCH ₂
44	CH ₃	OH	OH	H	CH ₂ OH	CHCH ₂
45	CH ₃	OH	OH	H	CH ₃	COCH ₃
46	CH ₃	OH	H	OH	CH ₂ OH	CCH
52	CH ₂ OH	OH	CHCH ₂	H	CH ₃	H

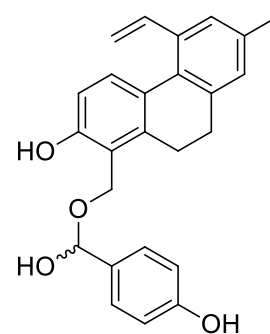
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
5	CHCH ₂	H	OH	H
17	CHCH ₂	H	CH ₃	H
47	H	OH	CH ₃	CCH



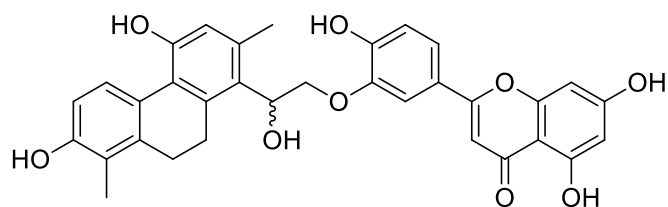
29



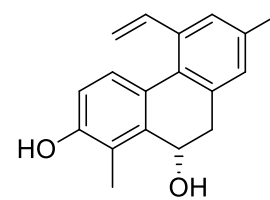
34



40

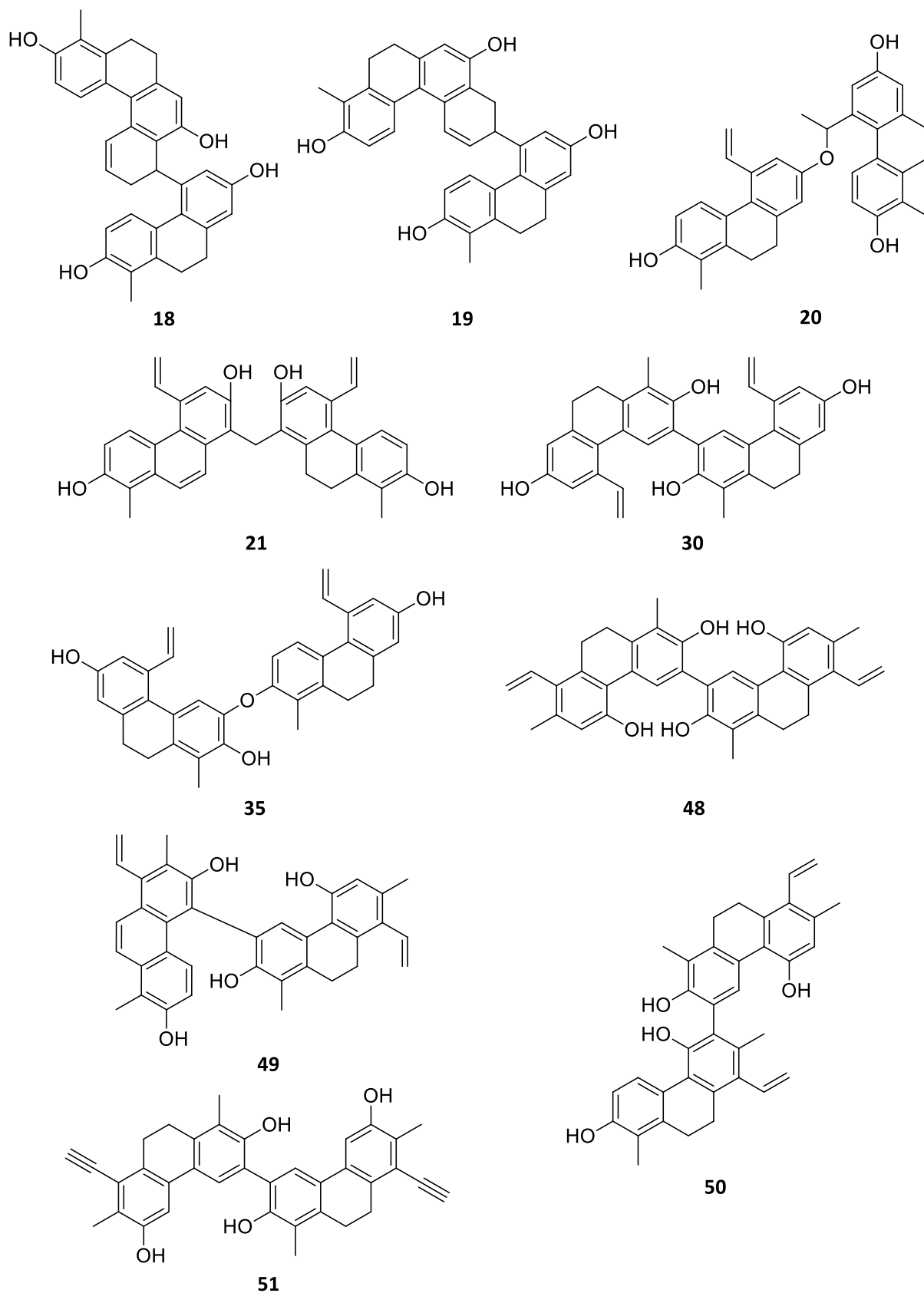


39

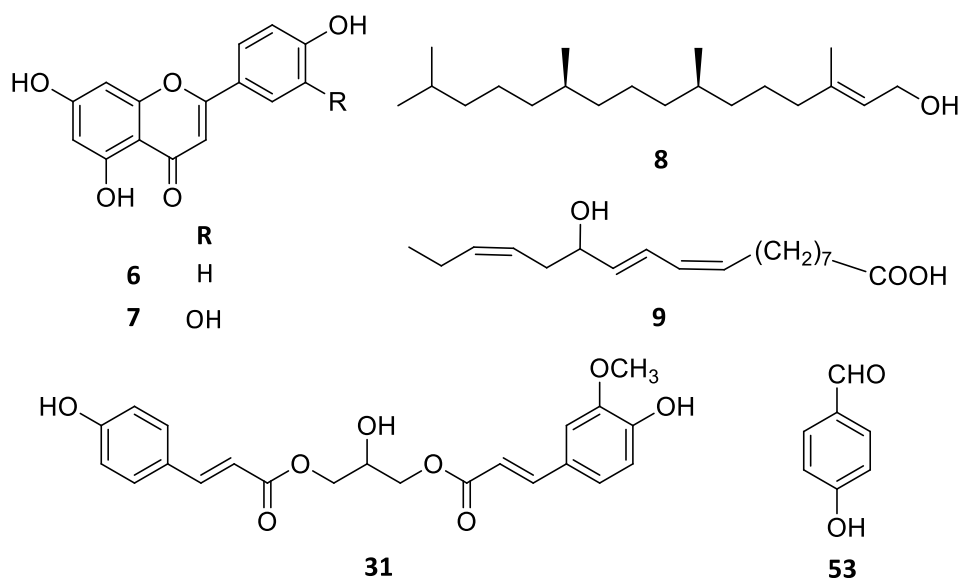


41

5a. ábra A négy vizsgált *Juncus* fajból izolált fenantrén monomerek szerkezete



5b. ábra A vizsgált *Juncus* fajokból izolált difenantrének szerkezete



5c. ábra A vizsgált *Juncus* fajokból izolált egyéb vegyületek szerkezete

Az izolált vegyületek biológiai aktivitása

Farmakológiai vizsgálataink elsősorban a fenantrének *in vitro* antiproliferatív hatásának tesztelésére irányultak. Célunk a vegyületek minél széleskörűbb vizsgálata volt, ezért számos humán tumoros sejtvonalon végeztük a tesztelést. A kísérleteket kiegészítettük normál sejteken történt mérésekkel is, hogy információt nyerjünk a vegyületek szelektivitásáról. Ezen kívül szinergizmus vizsgálatot is végeztünk a tumorterápiában széleskörűen alkalmazott doxorubicinnel. A vizsgálatokat MTT módszerrel végeztük, pozitív kontrollként ciszplatin, illetve doxorubicint alkalmaztunk.

A vizsgált tumoros sejtvonalak közül a HeLa sejtek bizonyultak legérzékenyebbnak a fenantrénekkel szemben. A *J. atratus*ból izolált fenantrének (**2–5**) hatásosabbnak mutatkoztak [IC_{50} 3,5 μ M (**2**), 2,9 μ M (**3**), 3,7 μ M (**4**) és 7,8 μ M (**5**)] a kontrollként alkalmazott ciszplatinnál (IC_{50} 12,4 μ M). A vegyületek a NIH-3T3 egér fibroblaszt sejtek növekedését még 30 μ M koncentrációban sem befolyásolták jelentős mértékben (35%-nál kisebb gátlás), ezért a vizsgált anyagok antiproliferatív hatása tumorszelektívnek tekinthető. Eredményeink alapján szerkezet-hatás összefüggések levezetésére is lehetőségünk nyílt. Az **1–3** jelzésű vegyületek csak a C-8-on található szubsztituensben különböznek egymástól. Mivel az **1**-es vegyület jelentősen gyengébb aktivitást mutatott, mint a **2** és **3**, ezért megállapítható, hogy az acetylcsoport jelenléte vinil- vagy acetylén csoport helyett a hatás szempontjából kedvezőtlen. A **4** és **5** vegyületek csak a B-gyűrű telítettségében különböznek egymástól, közülük a dihidrofenantrén effuzol (**4**) bizonyult hatásosabbnak. Végül metilcsoport jelenléte a C-gyűrűn nem befolyásolta jelentősen a fenantrének antiproliferatív hatását HeLa sejteken.

A *J. gerardi*ból izolált difenantrének (gerardiin I–L (**18–21**) és effuzuzin A (**30**)) szignifikánsan, koncentrációfüggő módon csökkentették a 4T1 sejtek viabilitását. Mivel mindegyik vegyület az effuzol (**4**) (**18–20** és **30**) vagy az effuzol és dehidroeffuzol (**5**) dimerje (**21**), a mono- és dimerek citotoxikus

hatását mind egér- és humán eredetű tumoros sejteken, mind normál sejteken (D3) teszteltük. Az eredmények alapján egyértelműen megállapítható, hogy a dimerek (**18–21** és **30**) a tumoros és normál sejtekre egyaránt citotoxikus hatásúak szemben a monomerekkel (**4** és **5**), amelyek egyáltalán nem vagy nagyon alacsony aktivitást mutattak. A dimerek közül az effuzuzin A (**30**) volt a legkevésbé citotoxikus, míg a geradiin I–L (**18–21**) sorozat tagjai esetén jelentős aktivitást tapasztaltunk. Eredményeinket alátámasztja az effuzuzin A (**30**) esetén A2780 humán petefészek eredetű tumoros sejteken Bús és munkatársai vizsgálatai során tapasztalt mérsékelt toxikus hatás. Az impedancia vizsgálat eredményei összhangban voltak az MTT assay-nél mért adatokkal, alátámasztva így a dimerek koncentrációfüggő toxicitását.

A **18** és a **19** jelzésű vegyületek IC_{50} értéke $10 \mu M$ alatt volt mindkét vizsgált sejtvonalon. A gerardiin K (**20**) esetén $10 \mu M$ -nál alacsonyabb IC_{50} értéket ($IC_{50} 8,1 \mu M$) csak az egér limfóma (4T1) sejteknél tapasztaltunk, az MDA-MB-231 sejtvonalon ez az érték $10,1 \mu M$ volt. A **21** jelzésű anyag az emlőtumor sejtek ellen volt hatásosabb ($IC_{50} 7,3 \mu M$) (4T1 sejtvonalon $IC_{50} 11,7 \mu M$). A D3 normál endotél sejtek kevésbé voltak érzékenyek a difenantrénekre; minden vegyület $10 \mu M$ feletti IC_{50} értékkel rendelkezett [$21,6 \mu M$ (**18**), $15,7 \mu M$ (**19**), $10,6 \mu M$ (**20**) és $13,7 \mu M$ (**21**)].

A *J. maritimus*ból izolált, két effuzol (**4**) egységből felépülő difenantrének (**30** és **35**) jelentős antiproliferatív hatást mutattak minden vizsgált sejtvonalon (HeLa, HTM-26, T-47D, A2780, A2780cis, MCF-7 és KCR). A legmagasabb aktivitást mindkét dimer esetén a T-47D sejteken tapasztaltuk ($IC_{50} 6,2 \mu M$ (**30**) és $9,1 \mu M$ (**35**)). Szignifikáns különbséget nem figyeltünk meg a különböző sejtvonalakon a két vegyület hatásában. A *J. maritimus*ból izolált egyéb fenantrének jelentős aktivitást mutattak egyes sejtvonalakon, pl. a maritin C (**34**) MCF-7 sejteken, a maritin B (**33**), a junkuzol (**24**) és az effuzol (**4**) HeLa sejteken.

A *J. ensifolius* fenantrénjei közül a luteolin-szubsztituált enzifolin A (**39**) a legígéretesebb, amely mindhárom vizsgált tumoros sejtvonalon aktívnak bizonyult (HeLa, COLO 205 és COLO320, IC_{50} értékek $3,9–12,7 \mu M$) és jó szelektivitást ($SI = 4,95$) mutatott COLO 205 sejteken. A vegyület aktivitása a pozitív kontrol ciszplatinnál mért érték több mint tízszerese volt COLO 205 sejtek esetén. Érdekes, hogy a luteolin (**7**), illetve az enzifolin A (**39**) fenantrén részéhez szerkezetileg nagyon hasonló enzifolin G (**45**) önmagában inaktívnak bizonyult minden sejtvonalon.

A legalacsonyabb IC_{50} értékeket a méhnyakrák (HeLa) sejtvonalon detektáltuk a **2** ($IC_{50} 6,65 \mu M$) és **3** ($IC_{50} 6,67 \mu M$) vegyületek esetén. A két anyag között mindössze a C-8-on található szubsztituensben van különbség [acetilén (**2**), illetve vinilcsoport (**3**)]. Habár az enzifolin E (**43**) csak a hidroxilcsoport kapcsolódási helyében különbözik a junkuenin B-től (**3**) (C-5 a **43** esetén és C-6 a **3**-nál), hatása szignifikánsan alacsonyabb volt a HeLa sejteken, míg a metilcsoport hidroximetil csoportra történő módosulása C-7 helyzetben az enzifolin F (**44**) esetén a hatás teljes elvesztését eredményezte. A **46** és **52** jelzésű vegyületek mérsékelt antiproliferatív aktivitást (IC_{50} értékek $12,31 \mu M$ és $10,56 \mu M$)

mutattak HeLa sejteken. Az enzifolin I (**47**) a szilvaticin A (**52**) dehidroszármazéka, a C-9–C-10 helyzetű kettős kötés kialakulása az aktivitás növekedését okozta a COLO 205 és COLO 320 adenokarcinoma sejteken, míg a hatás jelentősen csökkent HeLa sejtek esetén. A monomerek összekapcsolódása dimerekké az aktivitás csökkenését idézte elő a **47** és **51** jelzésű vegyületeknél, míg a **48** és **50** jelzésű anyagok esetén, amelyek az enzifolin E (**43**) dimerjei sem a monomer, sem a dimerek nem mutattak antiproliferatív hatást. A legjobb szelektivitást az enzifolin D (**42**, SI > 5,15, HeLa) és H (**46**, SI > 8,13, HeLa), valamint a **2** (SI > 3,91, HeLa), **3** (SI > 5,37, HeLa) és **52** (SI > 9,43, HeLa) jelű komponenseknél tapasztaltuk.

Végül, a *J. ensifolius*ból izolált valamennyi fenantrén hatását teszteltük egy kombinációs vizsgálat keretében HeLa sejteken, amelynek célja a vegyületek és a tumorelles hatóanyag doxorubicin közötti interakció *in vitro* vizsgálata volt. A kombinációs indexet (CI), amely alapján az interakció lehet szinergista (CI < 1), additív (CI = 1) vagy antagonist (CI > 1), a Chou és Talalay által kidolgozott módszer szerint határoztuk meg. Minden vegyület szinergista kölcsönhatást mutatott doxorubicinnel (CI < 1). Nagyon erős kölcsönhatást tapasztaltunk az enzifolin E (**43**) és H (**46**) esetén, ahol a CI értékek 0,1 alattiak voltak. Mindkét vegyület gyenge vagy mérsékelt aktivitást (IC₅₀ érték 25,2–31,2 µM a **43**, és 12,3–63,5 µM a **46** esetén) mutatott az antiproliferatív vizsgálat során.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk célja Juncaceae fajok fitokémiai és farmakológiai vizsgálata, ezen belül biológiailag aktív vegyületek izolálása és szerkezetmeghatározása volt négy hazánkban is előforduló *Juncus* fajból (*Juncus atratus*, *J. gerardii*, *J. maritimus* és *J. ensifolius*).

A preparatív munka során a lipofil növényi kivonatokat (CH₂Cl₂/CHCl₃ and EtOAc) többlépcsős elválasztástechnikai módszerek (OCC, VLC, MPLC, GF, PLC és HPLC) kombinálásával tisztítottuk és jutottunk végül a tiszta anyagokhoz. A vegyületek szerkezetmeghatározása spektroszkópiai módszerek (HR-MS és NMR) segítségével történt. Ezen kívül elvégeztük minden vegyület esetén a teljes ¹H és ¹³C NMR jelhozrendeléseket.

Munkánk eredményeként 53 vegyületet izoláltunk a négy vizsgált *Juncus* fajból, közülük 47 fenantrén típusú. Öt fenantrént (**1–5**), két flavonoidot (**6, 7**), egy alifás diterpént (**8**) és egy zsírsavat (**9**) azonosítottunk a *J. atratus*ból, 23 fenantrént (**4, 5, 10–30**) és egy glicerinszármazékot (**31**) a *J. gerardii*ból, 11 fenantrént (**4, 24, 26, 30, 32–38**) a *J. maritimus*ból és 17 fenantrént (**2, 3, 17, 39–52**), egy flavonoidot (**7**) és a 4-hidroxibenzaldehidet (**53**) a *J. ensifolius*ból. A *J. maritimus*ból izolált effuzol (**4**) kivételével minden vegyületet elsőként azonosítottunk a növényekből. A *J. atratus*, *J. gerardii* és *J. ensifolius* tartalomanyagait munkánkat megelőzően nem vizsgálták. Az izolált vegyületek közül fitokémiai és farmakológiai szempontból a fenantrének a legígéretesebbek. A 47 azonosított fenantrén közül 31 új természetes anyag. 37 Fenantrén monomer (33 dihidrofenantrén, 4 fenantrén), 10 pedig

dimer. A monomerek közül legérdekesebbek a flavonoid-, illetve 4-hidroxibenzaldehid addukt **39** és **40** jelzésű vegyületek. A **34** és **41** szintén figyelemre méltóak, a **34** esetén gyűrűzáródás történik a C-4 és C-13 között egy tetraciklusos vázat eredményezve, a **41** különlegessége pedig a C-10 helyzetű szubsztituáció. A **12**, **13**, **15** és a **16** komponensek glükozidok. A Juncaceae fenantrének jellegzetes szubsztituensei a C-1 helyzetű metil- és a C-2 helyzetű hidroxilcsoport, továbbá a vinil-, metil- és hidroxiszubsztituált C-gyűrű. Néhány esetben a C-1 helyzetű metilcsoport helyett metoximetilén- (**10**, **42**) vagy hidroximetil csoport (**52**), a hidroxilcsoport (C-2) helyett pedig metoxics csoport (**22**, **23**) található a molekulában. Ezen kívül egyes esetekben a C-gyűrűn a vinilcsoportot hidroxietil (**14–16**), metoxietil (**27**, **38**), aldehid (**26**), hidroximetil (**32**), acetyl (**1**, **45**) vagy acetylén (**2**, **46**) csoport váltja fel. A **29**-es vegyület különlegessége pedig egy karbonilcsoport jelenléte a molekulában.

A dimerek esetén leggyakrabban két effuzol (**4**) monomer kapcsolódik különböző módon egymáshoz C–C (**30**) vagy éterkötésen (**20**, **35**) keresztül. A **18** és **19** esetén a két monomer a vinilcsoportjain keresztül, egy heptaciklusos gyűrűrendszert létrehozva kapcsolódik. A **21**-es vegyületben egy effuzol (**4**) és egy dehidroeffuzol (**5**) kapcsolódásával alakul ki a dimer fenantrén. A **48** és **50** esetén két enzifolin E (**43**) egység kapcsolódik 3–3' vagy 6–3' helyzetben. A **49** esetén az enzifolin E (**43**) dehidrojunkuenin B-vel kapcsolódva dimerizálódik, az **51**-nél pedig két junkatrin B (**2**) monomer kapcsolódik 3–3' helyzetben egy szimmetrikus dimert alkotva.

A fenantréntartalom alapján a *J. gerardii* és a *J. ensifolius* jó fenantrénforrásoknak tekinthetők. A junkuzol (**24**) és az effuzol (**4**) a *Juncus* fajokban általános előforduló vegyületek, szinte minden eddig vizsgált fajban azonosították őket. Prekurzorként szolgálnak a többi Juncaceae fenantrén bioszintéziséhez.

A vinil-szubsztituált származékok kemotaxonómiai markerként szolgálhatnak a Juncaceae család fajai esetén, mivel ilyen vegyületeket eddig csak *Juncus* és *Luzula* fajokból írtak le. Napjainkig mindössze két *Luzula* faj (*L. luzuloides* és *L. sylvatica*) esetén végeztek átfogó fitokémiai vizsgálatot. A korábbi kutatások elsősorban a fajok flavonoidtartalmára fókuszáltak. Mivel az eddig vizsgált *Luzula* és *Juncus* fajok fenantréntartalma nagyon hasonló, ez megerősítheti a két nemzetség szoros botanikai rokonságát.

Farmakológiai szempontból a fenantrének antiproliferatív, illetve a tumorterápiában általánosan alkalmazott doxorubicinnel megfigyelt szinergista hatása emelhető ki. Az antiproliferatív vizsgálatok esetén a HeLa sejtek bizonyultak legérzékenyebbnek a vegyületek iránt. A **2–5**, **24** és **33** komponensek jelentős aktivitást [IC₅₀ értékek 2,3 μM (**2**), 2,9 μM (**3**), 3,7 μM (**4**), 7,8 μM (**5**), 0,5 μM (**24**), 11 μM (**33**) és 8,3 μM (**39**)] mutattak a méhnyakrák sejtek ellen. Az effuzol (**18–20**), illetve az effuzol és dehidroeffuzol kapcsolódásával keletkező (**21**) dimerek aktivitása összemérhető volt a pozitív kontrol doxorubicinnel a 4T1 [IC₅₀ értékek 7,8 μM (**18**), 5,6 μM (**19**) és 8,1 μM (**20**)] és MDA-MB-231 [IC₅₀ értékek 8,0 μM (**18**), 6,6 μM (**19**) és 7,3 μM (**21**)] sejteken. Érdekeség, hogy a monomerek

(4 és 5) inaktívak voltak, vagy csak nagyon alacsony aktivitással rendelkeztek az említett sejtvonalakon. A szintén effuzol monomerekből felépülő **30** és **35** jelzésű vegyületek jelentősen [IC_{50} 6,2 μ M (**30**) és 9,1 μ M (**35**)] gátolták a T-47D sejtek szaporodását. A luteolin-szubsztituált **39**-es vegyület a COLO 205 sejteken (IC_{50} 3,9 μ M) mutatott magas aktivitást. Végül a kombinációs vizsgálat során, amelyben a *J. ensifolius*ból izolált fenantréneket doxorubicinnel együtt adagolva teszteltük HeLa sejteken, a **43** és **46** jelzésű anyagok nagyon erős szinergista hatást mutattak a vegyülettel; CI értékük 0,1 alatti volt.

Eredményeink új fenantrének azonosításán túl, rámutatnak arra, hogy a Juncaceae család fajai ígéretes forrásai lehetnek új biológiailag aktív molekuláknak, amelyek kiindulási vegyületekként szolgálhatnak további tumorelles hatóanyagok megismeréséhez.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Hohmann Judit professzor asszonynak, hogy a Farmakognóziai Intézetben végezhettem tudományos munkám.

Őszinte köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Vasas Andreának, hogy bevezetett a fenantrének világába. Aki mindig ott volt, hogy válaszoljon a kérdéseimre, tanácsot adjon és munkára buzdítson. Szakmai tudása, embersége kiemelkedő. Nélküle nem jutottam volna el idáig. Mindig is csodáltam kitartását és szorgalmát. Igazi példakép számomra.

Külön köszönet Bakacs Lászlónak és Jakab Gusztávnak a növényi nyersanyag azonosításáért és begyűjtéséért.

Köszönettel tartozom Kúsz Norbertnek az NMR mérésekért és kiértékelésükért; Csorba Attilának, Kele Zoltánnak és Berkecz Róbertnek a tömegspektroszkópiai vizsgálatokért; Bérdi Péternek, Zupkó Istvánnak, Fazakas Csillának, Wilhelm Imolának, Krizbai A. Istvánnak, Kincses Annamáriának, Szemerédi Nikolettának és Spengler Gabriellának az antiproliferatív és a citotoxicitási vizsgálatokért.

Külön köszönet Éles Orsolyának, aki bevezetett a laboratóriumi munka világába, megalapozta tudásomat a későbbi sikeres kutatómunkához és megtisztelt barátságával.

Köszönettel tartozom a Farmakognóziai Intézet minden munkatársának a kutatásomban nyújtott segítségért és a jó hangulatért.

Különösen hálás vagyok családomnak, hogy támogató és bátorító háttérrel biztosítottak számomra.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Stefkó D**, Kúsz N, Csorba A, Jakab G, Bérdi P, Zupkó I, Hohmann J, Vasas A.
Phenanthrenes from *Juncus atratus* with antiproliferative activity
Tetrahedron **2019**, 75: 116-120. **IF: 2.233**
- II. **Stefkó D**, Kúsz N, Barta A, Kele Z, Bakacsy L, Szepesi Á, Fazakas Cs, Wilhelm I, Krizbai I. A., Hohmann J, Vasas A.
Gerardiins A–L and structurally related phenanthrenes from the halophyte plant *Juncus gerardii* and their cytotoxicity against triple-negative breast cancer cells
Journal of Natural Products **2020**, 83: 3058-3068. **IF: 4.05**
- III. Kúsz N, **Stefkó D***, Barta A, Kincses A, Szemerédi N, Spengler G, Hohmann J, Vasas A.
Juncaceae species as promising sources of phenanthrenes: antiproliferative compounds from *Juncus maritimus* Lam.
Molecules **2021**, 26: 999. **IF: 4.927**
- IV. **Stefkó D**, Kúsz N, Szemerédi N, Barta A, Spengler G, Berkecz R, Hohmann J, Vasas A.
Unique phenanthrenes from *Juncus ensifolius* and their antiproliferative and synergistic effects with the conventional anticancer agent doxorubicin against human cancer cell lines.
Pharmaceutics **2022**, 14: 608. **IF: 6.525**

* megosztott első szerző

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

- I. Orbán-Gyapai O, Liktör-Busa E, Kúsz N, **Stefkó D**, Urbán E, Hohmann J, Vasas A.
Antibacterial screening of *Rumex* species native to the Carpathian Basin and bioactivity-guided isolation of compounds from *Rumex aquaticus*
Fitoterapia **2017**, 118:101–106. **IF: 2.642**
- II. Bús Cs, Tóth B, **Stefkó D**, Hohmann J, Vasas A.
Family Juncaceae: promising source of biologically active natural phenanthrenes.
Phytochemistry Reviews **2018**, 17:833–851. **IF: 4.257**
- III. Bakacsy L., Sípos L., Barta A., **Stefkó D.**, Vasas A., Szepesi Á.
Concentration-dependent effects of effusol and juncusol from *Juncus compressus* on seedling development of *Arabidopsis thaliana*
Scientific Reports **2022**, 12: 1 Paper: 13870, 12 p. **IF: 4.997**

ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

1. Vasas A, Tóth B, Bús Cs, **Stefkó D**, Kúsz N, Hohmann J.
Juncaceae species: promising source of natural phenanthrenes
International PSE Symposium: New & Old Phytochemicals: Their Role in Ecology, Veterinary, & Welfare Francavilla al Mare (Chieti), Olaszország, 2017. szeptember 17-19.
2. Vasas A, Bús Cs, **Stefkó D**, Kúsz N, Tóth B, Hohmann J.
Juncaceae fajok, mint ígéretes fenantrénforrások
XV. Magyar Gyógynövény Konferencia: a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Gyógynövény Szakosztályának tudományos konferenciája
Visegrád, Magyarország, 2018. június 8-9.
3. **Stefkó D**, Kúsz N, Csorba A, Jakab G, Csupor D, Hohmann J, Vasas A.
Phytochemical investigation of *Juncus atratus* Krock.
The 66th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA) Sanghaj, Kína, 2018. augusztus 26-29. PO-132
4. **Stefkó D.**
Juncaceae fajok biológiailag aktív fenantrénjeinek izolálása és szerkezetmeghatározása
XIII. Clauder Ottó Emlékverseny
Budapest, Magyarország, 2018. október 14.

5. **Stefkó D**, Kúsz N, Csorba A, Bakacsy L, Szepesi Á, Hohmann J, Vasas A.
Isolation and structure determination of phenanthrenes from *Juncus gerardii*
Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences
Pécs, Magyarország, 2018. október 27.
6. **Stefkó D**, Barta A, Kúsz N, Csorba A, Bakacsy L, Szepesi Á., Hohmann J, Vasas A.
A *Juncus gerardii* fitokémiai vizsgálata
Fiatal Gyógynövénykutatók Fóruma: A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Gyógynövény
Szakosztályának tudományos konferenciája
Szeged, Magyarország, 2018. november 30.
7. **Stefkó D**, Barta A, Kúsz N, Csorba A, Kele Z, Bakacsy L, Szepesi Á, Bérdi P, Zupkó I, Hohmann J, Vasas A.
Mono- and diphenanthrenes with antiproliferative activity from *Juncus gerardii*
Trends in Natural Product Research - PSE Young Scientists' Meeting on Biochemistry, Molecular Aspects and
Pharmacology of Bioactive Natural Products
Budapest, Magyarország, 2019. június 19-22.
8. Bakacsy L, Frank E, Kovács H, Szöllősi R, Barta A, **Stefkó D**, Vasas A, Szepesi Á.
Bioactivity tests of compounds from *Juncus* species on antioxidant defence mechanisms of *Arabidopsis thaliana*
Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság X. Kongresszusa
Szeged, Magyarország, 2019. augusztus 29-30.
9. **Stefkó D**, Barta A, Kúsz N, Bakacsy L, Hohmann J, Vasas A.
Isolation of phenanthrenes from *Juncus maritimus*
Proceedings of the 25th International Symposium on Analytical and Environmental Problems
Szeged, Magyarország, 2019. október 7-8.
10. **Stefkó D**, Barta A, Kúsz N, Berkecz R, Spengler G, Kincses A, Bakacsy L, Hohmann J, Vasas A.
Phytochemical and pharmacological investigation of sea rush
Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences
Pécs, Magyarország, 2020. október 17.
11. **Stefkó D**, Kúsz N, Hohmann J, Vasas A.
Isolation of phenanthrenes from *Juncus ensifolius*
Proceedings of the 26th International Symposium on Analytical and Environmental Problems
Szeged, Magyarország, 2020. november 23-24.
12. Bakacsy L, Kovács H, Sípos L, Barta A, **Stefkó D**, Vasas A, Szepesi Á.
Az egyszikű *Juncus* fajok (szittyók) hatóanyagai
In: Poór P., Mézes M., Blázovics A. Oxidatív stressz és antioxidáns védekezés a növényvilágtól a klinikumig,
Magyar Szabadgyök Kutató Társaság
Budapest, Magyarország, 2020. 218 p. pp. 122-127, 5 p.
13. Bakacsy L, Kovács H, Sípos L, Barta A, **Stefkó D**, Vasas A, Szepesi Á.
Potential application of phenanthrenes from rushes as organic compounds for sustainable agriculture
1st International Symposium on Climate-resilient Agri-environmental Systems 2020
Dublin, Írország, 2020. november 4-6.
14. **Stefkó D**, Kúsz N, Szemerédi N, Spengler G, Hohmann J, Vasas A.
Biologically active phenanthrenes from four *Juncus* species native to Hungary
GA – 69th Annual Meeting 2021, Bonn, Germany Virtual conference, 2021. szeptember 5-8.
In: *Planta Medica: Natural products and medical plant research*; 2021, 87(15): 1251
15. **Stefkó D**.
Ensifolins A-M, new phenanthrenes from *Juncus ensifolius*
2nd Symposium of Young Researchers on Pharmacognosy
Szeged, Hungary, 2021. február 4.
16. Szepesi Á, Sípos L, Barta A, **Stefkó D**, Vasas A, Bakacsy L.
Bioactivity of rush-specific (*Juncus* sp.) compounds on antioxidant defence mechanisms of *Arabidopsis thaliana*
Redox Biology Congress
Ghent, Belgium, 2022. augusztus 24-26.