

***Juncus* fajok biológiailag aktív fenantrénjeinek izolálása és  
félszintetikus átalakítása**

Doktori értekezés tézisei

**Bús Csaba**

Farmakognóziai Intézet  
Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2021



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

**Farmakognóziai Intézet**

**Témavezető:**

**Vasas Andrea PhD**

***Juncus* fajok biológiailag aktív fenantrénjeinek izolálása és  
félszintetikus átalakítása**

PhD értekezés tézisei

**Bús Csaba**

**Komplex vizsga bizottság:**

Elnök: Prof. István Ilisz DSc

Tagok: Prof. Judit Hohmann DSc, Gábor Janicsák CSc

**Bíráló bizottság:**

Elnök: Prof. György Dombi DSc

Bírálok: Tibor György Balogh PhD, Sándor Gonda PhD

Tagok: Renáta Minorics PhD, Márta Palkó PhD

Szeged, Hungary

2021



## BEVEZETÉS

A Juncaceae család 8 nemzetségébe közel 500 növényfaj tartozik világszerte, amelyek közül a *Juncus* genusz (több mint 300 faj) a legjelentősebb. Számos *Juncus* fajt alkalmaznak a tradicionális kínai gyógyászatban, pl. a *Juncus effusus* afa, vérzés és torokgyulladás esetén. Egyiptomban a *J. rigidus* magját hasmenés és húgyúti bántalmak kezelésére használják.

A *Juncus* fajok jellegzetes tartalomanyagai a fenantrének. A fenantrének az aromás metabolitok egy ritka csoportját alkotják, amelyek a bioszintézis során feltételezhetően stilbének oxidatív gyűrűzárásával jönnek létre. Három fő csoportjuk a mono-, di- és trifenantrének. A monofenantrének a C-9 és C-10 atomok közötti kötés telítettsége alapján fenantrénekre és dihidrofenantrénekre oszthatók. Ezek a vegyületek ritka előfordulásúak, napjainkig közel 500 fenantrént azonosítottak különböző növényfajokból. Legjelentősebb fenantrénforrásnak az Orchidaceae és Juncaceae család fajai tekinthetők. Ritka előfordulásuknak és jellegzetes szubsztituáltságuknak köszönhetően a vegyületek fontos kemotaxonómiai markerek; vinilcsoporttal szubsztituált fenantréneket csak Juncaceae, míg prenilcsoportot tartalmazó vegyületeket eddig kizárólag Orchidaceae fajokból írtak le.

A Juncaceae család nyolc *Juncus* (*Juncus acutus*, *J. atratus*, *J. effusus*, *J. inflexus*, *J. maritimus*, *J. roemerianus*, *J. setchuensis* és *J. subulatus*) és két *Luzula* (*Luzula luzuloides* és *L. sylvatica*) fajából eddig több mint száz fenantrént izoláltak. A *Luzula* és *Juncus* fajok szekunder metabolit profilja jelentős átfedést mutat.

A fenantrének, illetve a fenantréntartalmú növények számos kutatási program tárgyát képezik, amelynek oka szerkezeti sokszínűségük mellett az, hogy a vegyületek ígéretes farmakológiai hatását számos vizsgálat igazolta. Több anyag rendelkezik *in vitro* jelentős antimikrobiális (baktérium-, gomba- és vírusellenes), citotoxikus, antioxidáns és gyulladáscsökkentő, valamint központi idegrendszerre és simaizmokra kifejtett hatással.

Nagyszámú természetes eredetű és szintetikus, kinoidális szerkezeti részt tartalmazó fenantrén esetén számoltak be jelentős antiproliferatív hatásról. Egy gyors és egyszerűen kivitelezhető módszer kinoidális vegyületek előállítására a hipervalens jód reagensek, például a [bisz(trifluoroacetoxi)]jodo]benzol (PIFA) alkalmazása. A PIFA egy nagy szelektivitású reagens, nem toxikus, enyhe körülmények között szobahőmérsékleten is megfelelő a reakcióképessége, és a legtöbb általánosan használt oldószerben gyorsan végbe mennek a vele végrehajtott kémiai reakciók.

A PhD munka összefoglalja két növényfaj, a *J. compressus* és *J. tenuis* vegyületeinek izolálásával, valamint három természetes eredetű fenantrén (junkuenin B, junkuzol és effuzol) félszintetikus származékainak előállításával és farmakológiai vizsgálatával kapcsolatos kutatási eredményeket.

## CÉLKITŰZÉSEK

A Juncaceae család fajai biológiailag aktív másodlagos anyagcseretermékek (pl. fenantrének) jelentős forrásai. Ezen kívül számos szintetikus és félszintetikus előállított fenantrénvázas vegyület mutatott ígéretes farmakológiai hatást. A Szegedi Tudományegyetem Farmakognóziai Intézetében indult kutatási program keretében végzett munkánk célja új, biológiailag aktív fenantrének izolálása, szerkezetmeghatározása és félszintetikus vegyületek előállítása volt, amelynek érdekében a következő feladatokat végeztük el:

- A *Juncus compressus* Jacq. és *Juncus tenuis* Willd. fenantrénjeinek izolálása és szerkezetmeghatározása.
- Az izolált vegyületek *in vitro* farmakológiai vizsgálata, és az eredmények alapján szerkezet-hatás összefüggések meghatározása.
- A kinoidális vegyületek jelentősebb farmakológiai aktivitását alapul véve az általunk izolált fenantrének oxidált félszintetikus származékainak előállítása.
- Az előállított vegyületek antiproliferatív hatásának vizsgálata, az eredmények összehasonlítása a kiindulási anyagok aktivitásával.
- A szerkezeti és farmakológiai vizsgálatok eredményei alapján szerkezet-hatás összefüggések megállapítása.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

A preparatív növénykémiai munkához szükséges növényi nyersanyagok begyűjtése virágzó állapotban történt, a *Juncus compressus* esetén 2014 júniusában Gyula körzetében (GPS koordináták: 46°35'46.19"N, 21°10'18.97"E), a *J. tenuis* esetén pedig 2019 júniusában, a Szegedi Tudományegyetem Fűvészkertjében. Ezt követően a növényi nyersanyagokat szobahőmérsékleten szárítottuk.

Félszintetikus származékképzéshez kiindulási anyagként a junkuenin B-t (1,5 g) a *Juncus inflexus* metanolos kivonatából izoláltuk kombinált kromatográfiás módszerek (VLC szilika gél állófázison és gélszűrés Sephadex LH-20 állófázison) alkalmazásával egy korábbi kísérlet során. A növény viszonylag nagy, kb. 0.043% mennyiségben tartalmazta a vegyületet.

A félszintetikus származékképzéshez [bisz(trifluoroacetoxi)jodo]benzolt (PIFA) és (diacetoxijodo)benzolt (PIDA) alkalmaztunk oxidálószerként.

A vegyületek izolálása kombinált kromatográfiás módszerekkel történt, oszlopkromatográfia (CC), vákuum-folyadék kromatográfia (VLC), közepes nyomású folyadékkromatográfia (MPLC), rotációs planár kromatográfia (RPC) és nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) alkalmazásával, normál (NP), és fordított (RP) fázisú szilikagél, poliamid és Sephadex LH-20 állófázisokon. A racém keverékek enantiomertiszta vegyületekké történő elválasztásához Lux amylose-1 oszlopot használtunk. Az izolált vegyületek jellemzése és szerkezetmeghatározása UV-spektroszkópia, nagy

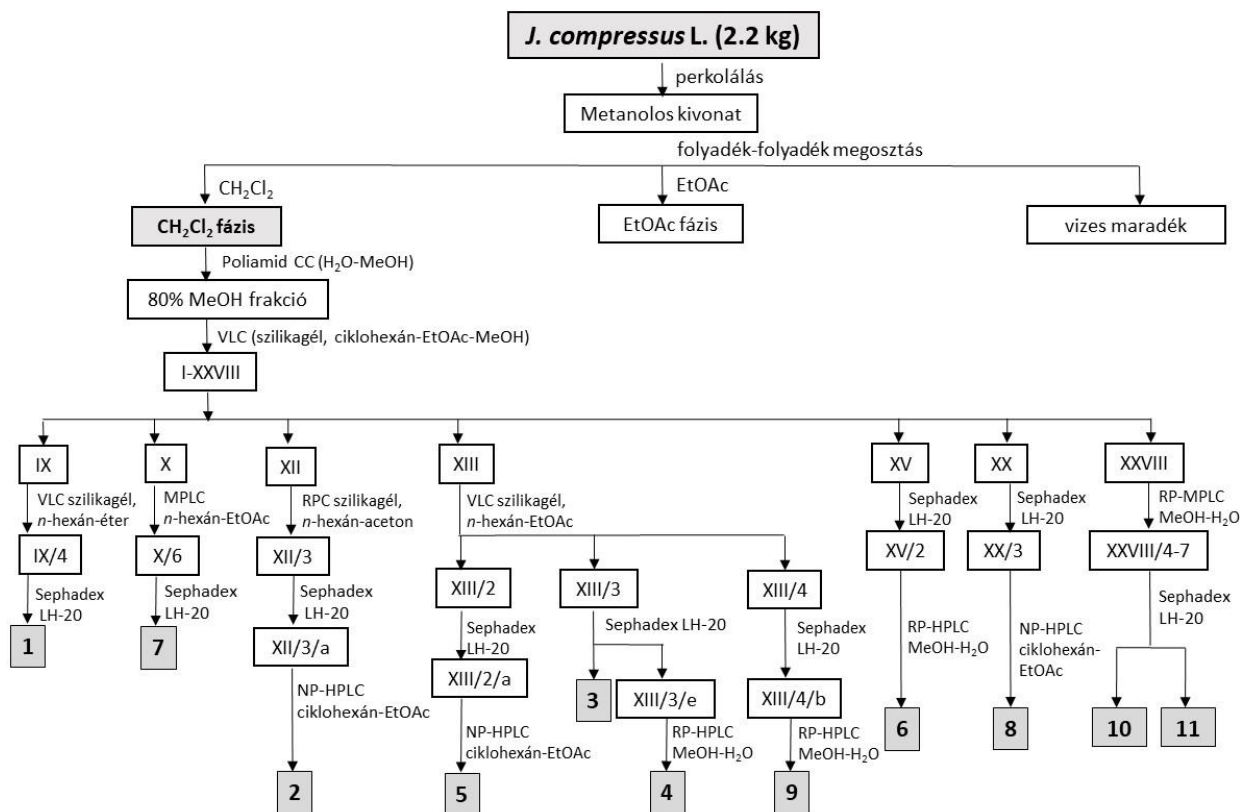
felbontású tömegspektroszkópia (HR-MS) és mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) segítségével történt. A királis vegyületek abszolút konfigurációját ECD mérésekkel és molekulamechanikai számításokkal határoztuk meg.

Az izolált vegyületek és félszintetikus származékaik *in vitro* antiproliferatív hatását különböző humán eredetű tumoros [emlő (MCF-7, T47D, KCR, HTB-26), méhnyak (HeLa, SiHa, C33A) petefészek (A2780, A2780cis)] és normál [NIH/3T3 (egér embrionális) és MCR-5 (humán embrionális tüdő fibroblaszt)] sejtvonalakon vizsgáltuk, MTT módszerrel. Pozitív kontrollként ciszplatint alkalmaztunk.

## EREDMÉNYEK

### A *Juncus compressus* fenantrénjeinek izolálása

A szárított növényi nyersanyagot aprítás után metanollal szobahőmérsékleten perkoláltuk. A metanolos kivonatot bepároltuk, 50%-os metanolban oldottuk, és folyadék-folyadék megosztást végeztünk diklórmetánnal és etil-acetáttal (1. ábra).



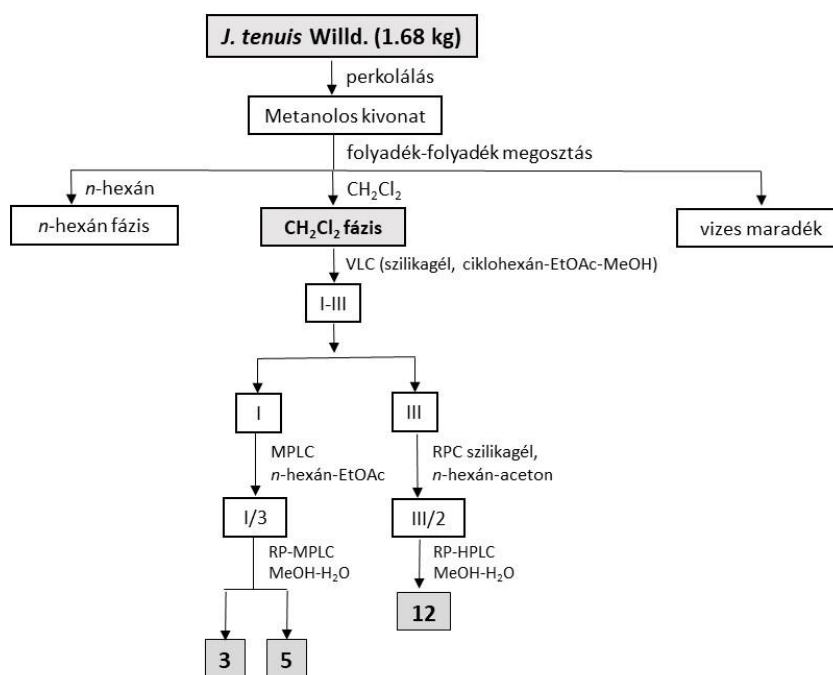
1. ábra. A *Juncus compressus* vegyületeinek izolálása

A diklórmetános fázist poliamid oszlopon frakcionáltuk, MeOH–H<sub>2</sub>O különböző polaritású elegyeivel (1:1, 4:1) végezve az elúciót, így 2 főfrakcióhoz jutottunk. Ezután a poliamid oszlopról 80%-os metanollal nyert frakcióval dolgoztunk tovább. Mivel ez a frakció kémiaiag nagyon komplexnek bizonyult, ezért először VLC-val, szilikagél állófázison, ciklohexán–EtOAc–MeOH gradiens elúciót

alkalmazva tisztítottuk, és 28 frakciót nyertünk (I–XXVIII). Ezt követően a frakciókat egyre szelektívebb elválasztástechnikai módszerekkel (RPC, MPLC, GF és HPLC), normál és fordított fázisú szilikagél, valamint Sephadex LH-20 gél állófázison tisztítottuk. Kombinált kromatográfiás módszerekkel 11 vegyületet (**1–11**) izoláltunk (**1. ábra**).

### A *Juncus tenuis* vegyületeinek izolálása

A növényi mintát ebben az esetben is szobahőmérsékleten szárítottuk (1,68 kg), majd aprítás után metanollal perkoláltuk. A kivonatot bepároltuk, majd 50%-os metanolban oldottuk és folyadék-folyadék megosztást végeztünk *n*-hexánnal és diklórmetánnal (**2. ábra**). Ezt követően a diklórmetános fázist frakcionáltuk VLC-val, szilikagél állófázison, ciklohexán–EtOAc–MeOH gradiens elúciót alkalmazva. A frakciók egyesítése után 3 főfrakcióhoz jutottunk (I–III). A komponensek tisztítását elválasztástechnikai módszerek kombinált alkalmazásával (RPC, MPLC, HPLC) végeztük, és 3 vegyületet izoláltunk (**3, 5 és 12**).



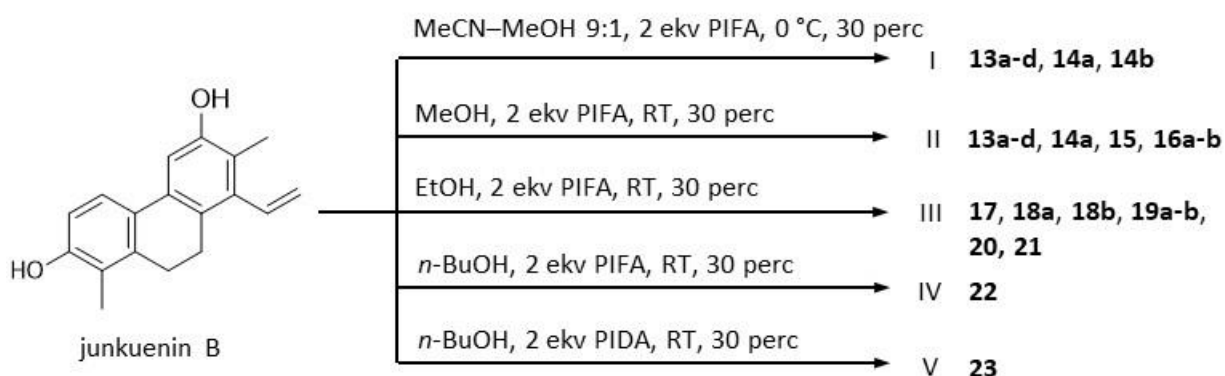
**2. ábra.** A *Juncus tenuis* vegyületeinek izolálása

### A junkuenin B félszintetikus származékainak előállítás

A kísérletek fő célja a fenantrén kémiai terének kiterjesztése, változatos szerkezetű vegyületek előállítása volt. Junkuenin B-ből kiindulva, hipervalens jód (III) reagensek alkalmazásával, öt reakciófolyamat (I–V) során (PIFA-t az I–IV számú, és PIDA-t az V számú reakcióban), 11 racém, illetve enantiomertiszta királis félszintetikus származékot (**13–23**) állítottunk elő (**3. ábra**). A kísérletek során különböző reakciókörülményeket alkalmaztunk [MeCN–MeOH (I), MeOH (II), EtOH (III), *n*-BuOH (IV, V)]. Az 50, illetve 100 mg kiindulási anyagot 1 mg/mL koncentrációban oldottuk, amelyhez 2 ekvivalens



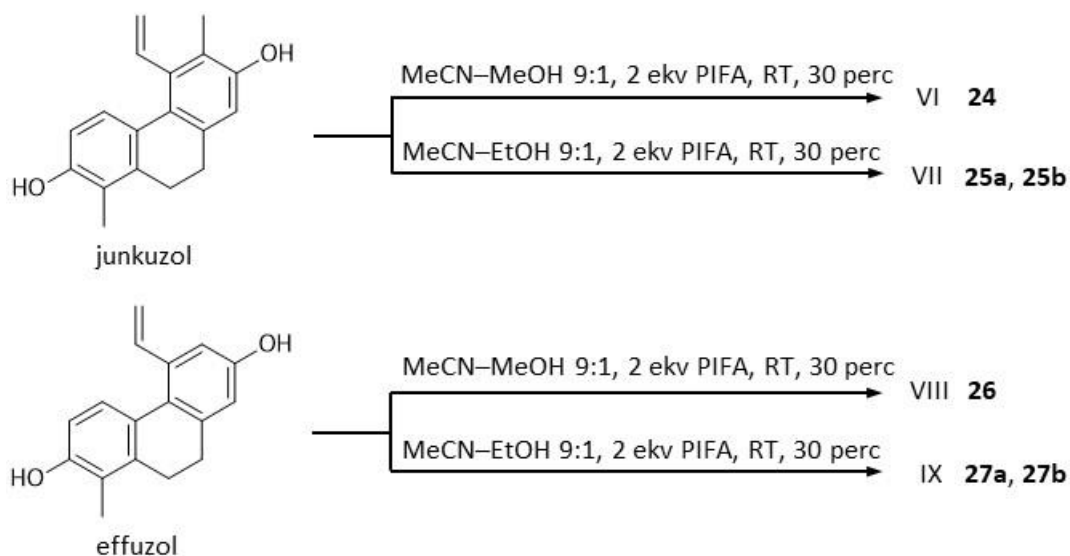
reagenst adtunk. Minden reakció 30 percig zajlott szobahőmérsékleten (az I. reakció esetében 0° C hőmérsékleten), kevertetéssel. A reakcióidő lejártá után a reakcióelegyeket szilárd fázisú extrakcióval dolgoztuk fel, így módon eltávolítva a reagensfelesleget és az esetleges bomlástermékeket. Ezt követően a keverékek tisztítása MPLC és HPLC módszerek alkalmazásával történt.



**3. ábra.** A juncuenin B félszintetikus származékainak előállítása

#### A junkuzol és az effuzol félszintetikus származékainak előállítása

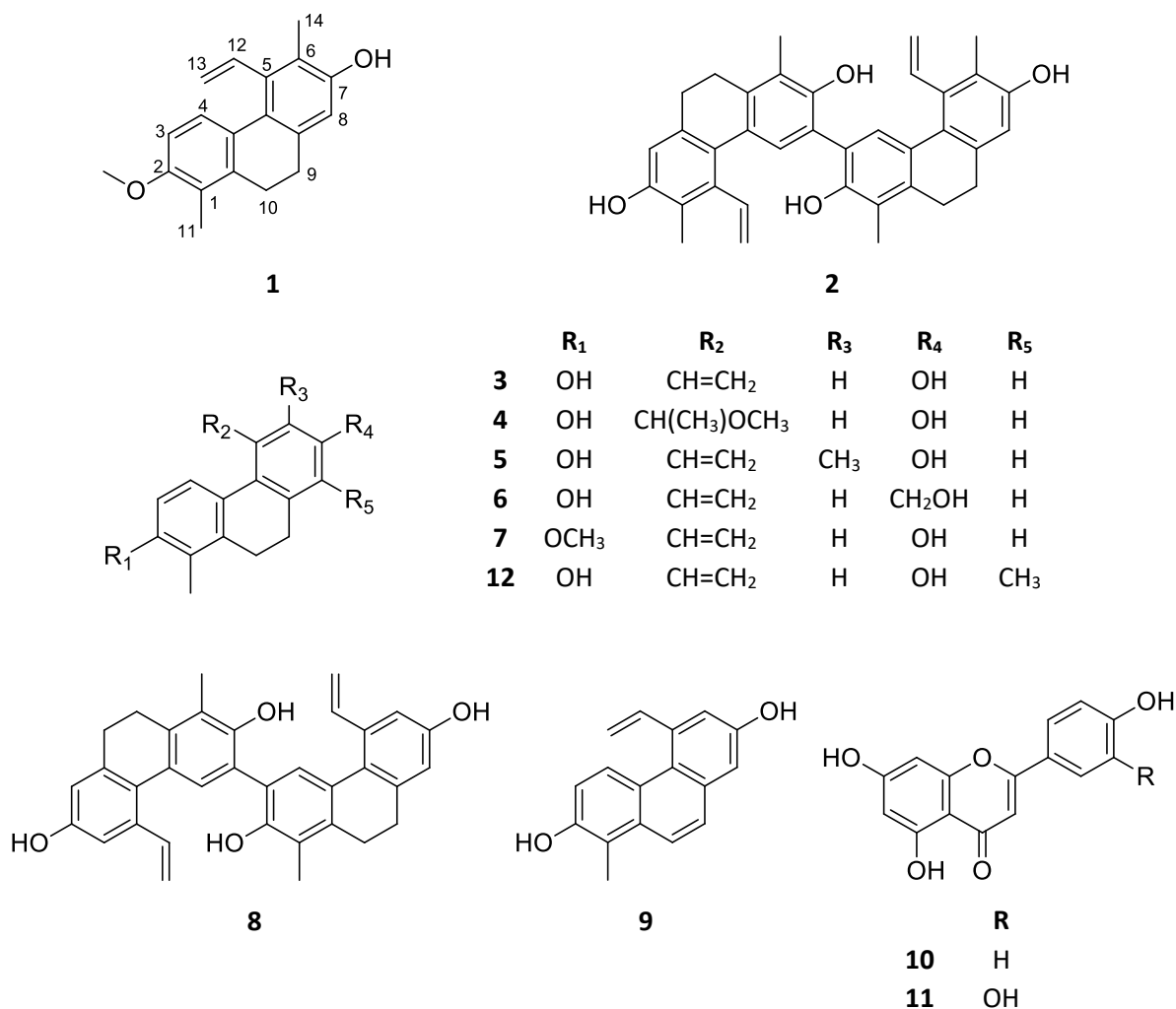
A junkuzollal és effuzollal végzett reakciók során 50 mg kiindulási anyagot 1 mg/mL koncentrációban oldottunk, és 2 ekvivalens oxidálószerrel adtuk hozzá. Reagensként PIFA-t alkalmaztunk különböző reakcióközegekben [MeCN–MeOH 9:1 (VI és VII) és MeCN–EtOH 9:1 (VIII és IX)] (**4. ábra**). Minden reakciókeveréket 30 percig kevertettünk szobahőmérsékleten. A reakciókeverékeket MPLC módszerrel frakcionáltuk, a vegyületek végső tisztítását HPLC módszerrel végeztük.



**4. ábra.** A junkuzol és effuzol félszintetikus származékainak előállítása

### A *J. compressus* és a *J. tenuis* tartalomanyagai

A *J. compressus* metanolos kivonatából 11 vegyületet [9 fenantrén (**1–9**) és 2 flavonoid (**10, 11**)], a *J. tenuis* metanolos extraktumából pedig három komponenst (**3, 5** és **12**) azonosítottunk (**5. ábra**). A vegyületek szerkezetét HR-MS mérésekkel, valamint 1D ( $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$ ) és 2D NMR ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HSQC, HMBC, NOESY) spektroszkópiás módszerekkel, valamint az irodalmi adatokkal végzett összevetéssel határoztuk meg.



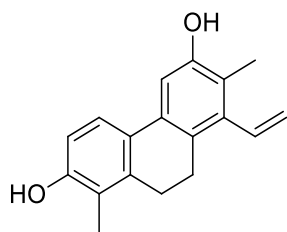
**5. ábra.** A *J. compressus*ból és *J. tenuis*ból izolált vegyületek (**1–12**)

Az **1** és **2** jelzésű vegyületet, a kompresszin A-t és B-t, új természetes eredetű metabolitokként azonosítottuk. Ezek mellett öt dihidrofenantrént [effuzol (**3**), effuzol (**4**), junkuzol (**5**), 2-hidroxi-1-metil-2-metoxi-5-vinil-9,10-dihidrofenantrén (**6**), 7-hidroxi-1-metil-2-metoxi-5-vinil-9,10-dihidrofenantrén (**7**)], egy fenantrént [dehidroeffuzol (**9**)], egy fenantrén dimert [effuzuzin A (**8**)], és két flavonoidot (apigenin és luteloin (**10, 11**)) izoláltunk a növényből.

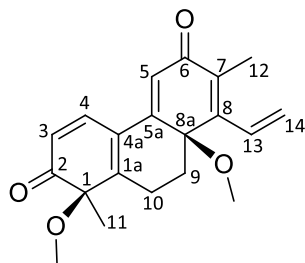
A junkuzol (**3**) és effuzol (**5**) mellett egy további ismert fenantrént, nevezetesen a 2,7-dihidroxi-1,8-dimetil-5-vinil-9,10 dihidrofenantrént (**12**) izoláltuk a *J. tenuis* metanolos kivonatából.

## A junkuenin B félszintetikus származékai

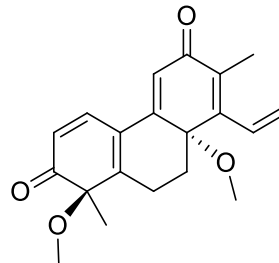
A *J. inflexus* gyökeréből izolált junkuenin B-ből öt reakció eredményeként – a reagensek, reakcióközegek és a hőmérséklet változtatásával – 11 félszintetikus származékot (**13–23**) állítottunk elő (**6. ábra**).



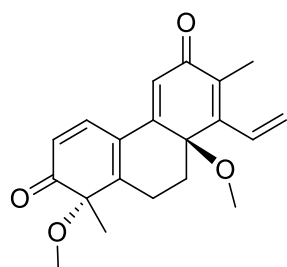
junkuenin B



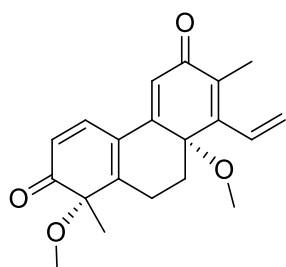
(1*R*,8*aR*)-**13a**



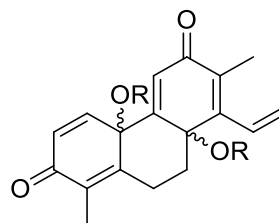
(1*R*,8*aS*)-**13b**



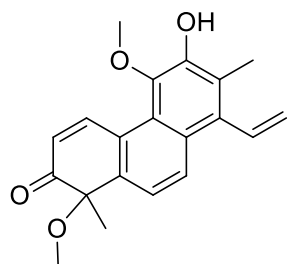
(1*S*,8*aR*)-**13c**



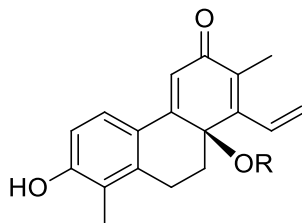
(1*S*,8*aS*)-**13d**



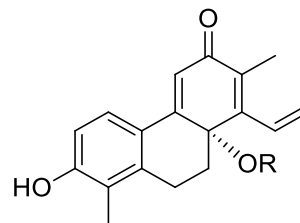
R=CH<sub>3</sub> *ent*-**14a**, *ent*-**14b**  
R=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> *rac*-**17**



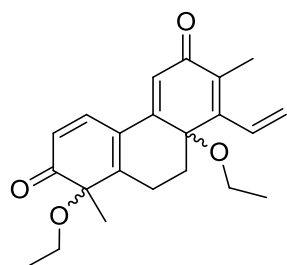
*rac*-**15**



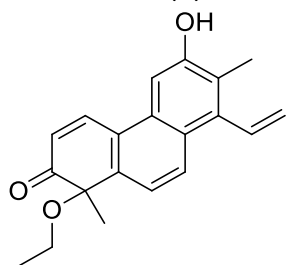
R=CH<sub>3</sub> (*R*)-**16a**  
R=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (*R*)-**19a**



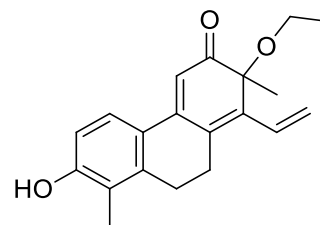
R=CH<sub>3</sub> (*S*)-**16b**  
R=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (*S*)-**19b**



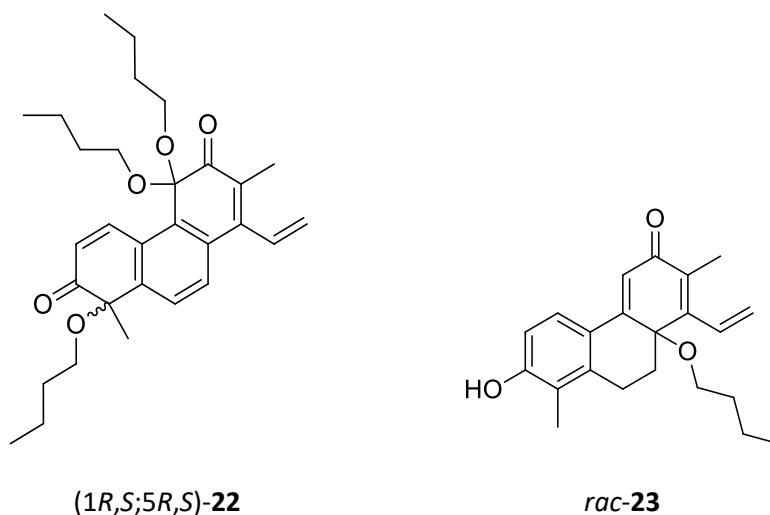
*ent*-**18a**, *ent*-**18b**



*rac*-**20**



*rac*-**21**

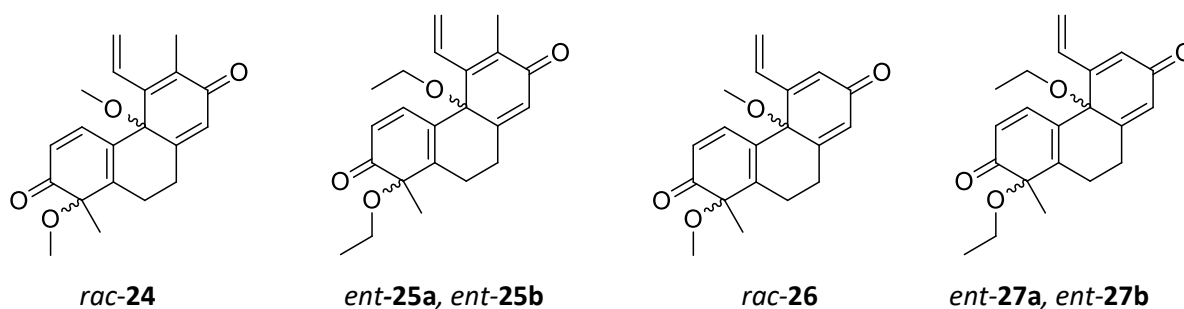


**6. ábra.** A junkuenin B félszintetikus származékai (**13–23**)

Valamennyi vegyület királis, legtöbbjük *o*- vagy *p*-kinol gyűrűt tartalmaz, és a molekulák az alkalmazott reakció közegtől függően metoxi-, etoxi-, illetve *n*-butoxi-csoporttal szubsztituáltak. A farmakológiai vizsgálatok első lépéseként a racém vegyületeket teszteltük MTT módszer segítségével. Az eredmények alapján a **13a-d**, **16a-b** és **19a-b** vegyületeket királis oszlopon enantiomertiszta vegyületekké választottuk el, a további vizsgálatok ezekkel az anyagokkal történtek.

#### A junkuzol és effuzol félszintetikus származékai

A *J. tenuis* metanolos kivonatából izolált effuzolból (**3**) és junkuzolból (**5**) négy vegyületet (**24–27**) állítottunk elő, négy, különböző körülmények között végrehajtott reakciófolyamat eredményeként (**7. ábra**). A **24** és **25** jelzésű komponensek junkuzol, míg a **26** és **27** jelzésűek effuzol analógok. A vegyületek keverékekből történő izolálásához és tisztításához MPLC és HPLC módszereket alkalmaztunk.



**7. ábra.** A junkuzol és az effuzol félszintetikus származékai

Az előállított vegyületek racém keverékek, valamennyi anyag *o*- és *p*-kinol gyűrűket tartalmaz és metoxi-, illetve etoxycsoporttal szubsztituált. A molekulák legfontosabb szerkezeti sajátossága az oldalláncok jelenléte a C-5a szénatomon. Összehasonlítva ezeket a szerkezeteket a természetben előforduló fenantrénekével speciális esetnek tekinthetők, ugyanis sem a természetes fenantrének

között, sem pedig az előzőekben bemutatott junkuenin B származékok között nem található ilyen módon szubsztituált vegyület. Ez a szerkezet a farmakológiai hatások tekintetében is érdekesnek mutatkozott.

#### A *J. compressus* fenantrénjeinek antiproliferatív hatásvizsgálata

Az izolált fenantrének antiproliferatív hatását MTT módszerrel vizsgáltuk. A *J. compressus*ból izolált fenantréneket három tumoros sejtvonalon [Hela és SiHa (méhnyakrák), A2780 (petefészek adenokarcinóma)] teszteltük, pozitív kontrollként ciszplatint alkalmaztunk (**1. táblázat**).

**1. táblázat** A *J. compressus*ból izolált fenantrének antiproliferatív hatása (IC<sub>50</sub>)

Vegyület	Koncentráció (μM)	Gátlási százalék (%) ± SEM [számolt IC <sub>50</sub> érték (μM)]		
		HeLa	SiHa	A2780
<b>1</b>	10	41.7 ± 1.1	–	47.6 ± 1.6
	30	93.7 ± 0.4	38.6 ± 0.8	73.0 ± 0.5
		<b>11.3</b>		<b>13.2</b>
<b>2</b>	10	92.0 ± 0.4	–	–
	30	92.4 ± 0.2	32.8 ± 0.9	64.9 ± 2.0
		<b>1.9</b>		
<b>3</b>	10	96.4 ± 0.3	–	–
	30	97.8 ± 0.3	–	50.5 ± 1.6
		<b>3.7</b>		
<b>4</b>	10	–	–	18.3 ± 0.4
	30	30.4 ± 1.9	14.2 ± 2.8	72.1 ± 1.1
<b>5</b>	10	97.7 ± 0.4	17.1 ± 2.4	18.1 ± 1.3
	30	97.8 ± 0.2	29.3 ± 2.0	63.4 ± 1.0
		<b>1.3</b>		
<b>6</b>	10	96.8 ± 0.3	–	–
	30	98.8 ± 0.2	10.3 ± 1.5	–
		<b>4.2</b>		
<b>7</b>	10	45.4 ± 1.6	14.2 ± 1.0	–
	30	92.4 ± 0.2	29.5 ± 3.4	63.2 ± 2.5
		<b>10.7</b>		
<b>8</b>	10	–	–	–
	30	10.5 ± 0.5	14.4 ± 1.5	72.7 ± 1.8
<b>9</b>	10	75.2 ± 2.5	–	–
	30	96.5 ± 0.3	28.7 ± 2.0	57.3 ± 2.6
		<b>7.8</b>		
<b>ciszplatin</b>	10	42.6 ± 2.3	88.6 ± 0.5	83.6 ± 1.2
	30	99.9 ± 0.3	90.2 ± 7.8	95.0 ± 0.3
		<b>12.4</b>	<b>7.8</b>	<b>1.3</b>

Az izolált vegyületek antiproliferatív hatásvizsgálatának eredményeiből szerkezet-hatás összefüggések levezetésére nyílt lehetőségünk. Mivel a **4-es** vegyület kisebb aktivitással rendelkezik, megállapítható, hogy egy, a vinilcsoportnál nagyobb térkitöltésű funkciós csoport csökkenti a farmakológiai hatást. A szabad hidroxilcsoporttal rendelkező vegyületek (pl. a **3-as** vegyület) esetében

magasabb aktivitást detektáltunk, mint a metil-éter (**7**) vagy az oximetilén (**6**) analóg esetén. A két difenantrén (**2** és **8**) hatásának különbsége a C-6-hoz kapcsolódó metilcsoport jelenlétével magyarázható, amely a monofenantrének esetében is kedvezően befolyásolja az antiproliferatív hatást. Az **1**, **4** és **8** jelzésű vegyületek esetén jelentős gátló hatást detektáltunk az A2780 sejtvonalon, azonban egyik sem volt összemérhető a pozitív kontroll ciszplatín aktivitásával. Megállapítottuk továbbá, hogy egyik fenantrén sem mutatott számottevő gátlást (>40 %) SiHa sejtvonalon.

#### A junkuenin B félszintetikus származékainak antiproliferatív hatásvizsgálata

Az előállított vegyületek széleskörű farmakológiai vizsgálatának első lépéseként a racém vegyületek antiproliferatív hatását teszteltük humán eredetű emlő (MCF-7, T47D), méhnyak (HeLa, SiHa, C33a) és petefészek (A2780) tumoros sejtvonalakon, pozitív kontrollként ciszplatint alkalmaztunk. A vegyületek tumorszelektivitásának jellemzésére, a méréseket nem tumoros sejtvonalon (NIH/3T3) is elvégeztük. Szerkezet-hatás összefüggésként megállapítható, hogy a *p*-kinol gyűrűt nem tartalmazó vegyületek (**15**, **20**, **21**), valamint a két *p*-kinol gyűrűvel rendelkező molekulák (**14**, **17**) nem mutattak antiproliferatív hatást. Ezek a vegyületek C-4a helyzetben alkoxisubsztituáltak. A kiindulási anyag értékeivel összehasonlítva a legnagyobb gátlást mutató racém keverékeket (**13a-d**, **16a-b**, **19a-b**) enantiomertiszta vegyületekké választottuk el a további vizsgálatokhoz. A második lépésben ezeknek az anyagoknak (**13a**, **13b**, **13c**, **13d**, **16a**, **16b**, **19a** és **19b**) az antiproliferatív hatását teszteltük az előző sejtvonalakon (**2. táblázat**).

**2. táblázat** Az enantiomertiszta junkuenin B analógok antiproliferatív hatása (IC<sub>50</sub>)

Vegyület	Számolt IC <sub>50</sub> értékek (μM ± SEM)						
	MCF-7	T47D	HeLa	SiHa	C33a	A2780	NIH/3T3
(1 <i>R</i> ,8 <i>aR</i> )- <b>13a</b>	>30	>30	>30	>30	14.8±0.7	13.3±1.5	>30
(1 <i>R</i> ,8 <i>aS</i> )- <b>13b</b>	>30	>30	>30	>30	10.2±1.7	9.0±1.0	>30
(1 <i>S</i> ,8 <i>aR</i> )- <b>13c</b>	>30	12.5±0.9	>30	28.1±0.1	5.3±0.9	7.7±0.6	21.6±0.4
(1 <i>S</i> ,8 <i>aS</i> )- <b>13d</b>	>30	>30	>30	>30	13.0±0.2	11.0±0.4	>30
(8 <i>aR</i> )- <b>16a</b>	6.2±1.6	>30	0.9±0.4	>30	5.3±0.6	8.7±0.8	25.8±4.6
(8 <i>aS</i> )- <b>16b</b>	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
(8 <i>aR</i> )- <b>19a</b>	20.6±0.3	8.8±1.1	3.7±0.9	>30	4.9±0.3	2.8±0.3	>30
(8 <i>aS</i> )- <b>19b</b>	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30

IC<sub>50</sub> (μM, szórás ± SEM), MTT módszer, 0.1–30 μM tesztanyag koncentráció, inkubációs idő 72 óra, két párhuzamos mérés.

A vegyületek közül a **13c**, **16a** és **19a** bizonyult a leghatásosabbnak; HeLa és T47D sejtvonalakon a ciszplatinnal összemérhető gátlást tapasztaltunk. Legígéretesebb vegyület a (8*aR*)-**16a**, amely a T47D és SiHa sejtvonalak kivételével valamennyi sejtvonalon jelentős antiproliferatív hatást mutatott, azonban a nem tumoros NIH/3T3 sejtvonalon inaktív volt.

A **16a**, **16b**, **19a**, **19b**, és **23** vegyületek egy nem oxidált A gyűrűt tartalmaznak, C gyűrűjük pedig *p*-kinoidális, amelyhez egy alkil-étercsoport kapcsolódik. Ezen vegyületek esetén, a C-8a atomhoz kapcsolódó szubsztituens lánchossza nem egyértelmű módon befolyásolja a vegyületek antiproliferatív hatását: a T47D, C33A és A2780 sejtvonalakon a **19a** vegyület bizonyult leghatásosabbnak, amely egy etoxicsoporttal szubsztituált. A HeLa sejtvonal esetében a kapcsolódó szubsztituens alkilánc hosszának növekedésével csökkenő aktivitást detektáltunk (IC<sub>50</sub> értékek **23** > **19a** > **16a**).

A **16a** és **19a** vegyületek jelentős gátlást mutattak a HeLa, C33A, MCF-7 és A2780 sejtvonalakon, és ez a hatás összemérhetőnek bizonyult a junkuenin B aktivitásával. **16b** és **19b** sztereoizomereik azonban nem gátolták jelentősen a sejtproliferációt, ebből arra következtettünk, hogy a (8aR) a hatás szempontjából kedvező konfiguráció.

A **13a-d** vegyületek esetén elmondható, hogy az (1S,8aR)-konfiguráció (**13c**) bizonyult a legelőnyösebbnek az antiproliferatív hatás szempontjából. Az (1S,8aR)-**13c**, (*R*)-**16a**, és (*R*)-**19a** vegyületek IC<sub>50</sub> értékei alapján megállapítottuk, hogy a (8aR) konfiguráció egy fontos szerkezeti kritérium a magasabb tumorelles aktivitás szempontjából. Mivel a **13a** kevésbé bizonyult hatásosnak mint a **13c**, így az (1S) konfiguráció kedvezőbb a két aszimmetriacentrummal rendelkező vegyületek esetén.

### A junkuzol és effuzol analógok antiproliferatív hatásának vizsgálata

A *J. tenuis*-ből izolált fenantrének, valamint a vegyületek félszintetikus analógjainak antiproliferatív hatását humán eredetű emlő (MCF-7, KCR, T47D, és HTB-26), méhnyak (HeLa), és petefészek (A2780 és A2780cis) tumoros sejtvonalakon teszteltük (**3. táblázat**).

**3. táblázat** A *J. tenuis* vegyületeinek, valamint a junkuzol és effuzol félszintetikus származékainak antiproliferatív hatása (IC<sub>50</sub>)

Vegyület	Számolt IC <sub>50</sub> értékek (μM ± SEM)							
	A2780	A2780cis	KCR	MCF-7	HeLa	HTB-26	T47D	MRC-5
<b>12</b>	23.8±1.3	37.1±2.8	35.8±1.7	37.1±1.1	0.5±0.0	41.7±3.5	25.0±0.4	40.9±2.0
<b>5</b>	33.1±3.1	30.4±0.4	39.3±1.6	48.6±3.4	2.3±0.7	57.0±2.7	24.6±1.9	60.1±5.1
<b>3</b>	22.3±2.7	16.9±4.7	24.2±2.1	12.9±0.2	24.7±0.3	22.8±0.2	14.2±1.1	18.9±4.0
<i>rac</i> - <b>24</b>	80.3±3.0	88.2±3.1	>100	52.1±4.8	>100	74.3±3.6	36.5±1	>100
<i>ent</i> - <b>25a</b>	66.0±4.4	62.9±1.7	>100	80.5±3.5	94.7±3.4	94.3±2.0	56.3±3.4	>100
<i>ent</i> - <b>25b</b>	39.4±3.1	38.0±4.6	44.2±2.6	41.0±0.9	61.9±0.3	45.8±3.2	30.3±2.5	57.7±0.3
<i>rac</i> - <b>26</b>	8.6±0.5	10.9±2.2	18.9±1.4	5.8±0.2	12.9±0.4	10.9±0.9	7.0±1.0	12.2±0.2
<i>ent</i> - <b>27a</b>	25.2±1.8	22.5±0.2	23.5±0.8	11.7±0.7	24.4±0.8	16.1±0.2	11.6±0.3	14.3±0.5
<i>ent</i> - <b>27b</b>	22.0±2.0	22.1±1.6	29.4±0.9	10.2±0.1	35.0±1.5	20.1±1.1	14.2±0.6	23.4±1.3
<b>ciszplatin</b>	3.6±0.3	7.3±0.2	6.7±0.4	1.4±1.1	2.3±0.1	20.1±0.2	5.9±0.1	0.6±0.1

IC<sub>50</sub> (μM, szórás ± SEM), MTT módszer, 0.19–100 μM tesztanyag koncentráció, inkubációs idő 72 óra, két párhuzamos mérés.

A vizsgálat eredményeként megállapítottuk, hogy a természetes eredetű fenantrének közül a 2,7-dihidroxi-1,8-dimetil-5-vinil- 9,10-dihidrofenantrén (**12**) volt a leghatásosabb valamennyi vizsgált sejtvonalon, a HeLa sejtek kivételével. A junkuzol (**5**) és effuzol (**3**) molekulák szerkezetében az egyedüli

különbség egy metilcsoport kapcsolódása C-6 helyzetben a junkuzol esetén. A junkuzol (**5**) és effuzol (**3**) jelentős antiproliferatív hatást mutattak HeLa sejtvonalon [ $IC_{50}$  = 0.5  $\mu$ M (**5**) és 2.3  $\mu$ M (**3**)].

A származékok közül a **26** jelzésű vegyület bizonyult a legígéretesebbnek; jelentős tumorellenes hatást mutatott minden tesztelt sejtvonalon, kivéve a KCR-t, és ezek az értékek összemérhetők a pozitív kontrollként alkalmazott ciszplatinéval. Azonban a vegyület jelentősen ( $IC_{50}$  = 12.2  $\mu$ M) gátolta a nem tumoros MCR-5 sejteket is. A **27a** és **27b** jelzésű vegyületek gátló hatást mutattak MCF-7 sejteken ( $IC_{50}$  = 11.7  $\mu$ M (**27a**) és 10.2  $\mu$ M (**27b**)). Ugyanezen a sejtvonalon a 2,7-dihidroxi-1,8-dimetil-5-vinil-9,10-dihidrofenantren (**12**)  $IC_{50}$  értéke 12.9  $\mu$ M volt. Egyetlen junkuzol analóg aktivitása sem haladta meg a kiindulási anyag antiproliferatív hatását. Bár a **24** és **25a** jelzésű vegyületek inaktívnak bizonyultak az egészséges (MRC-5) sejtekkel szemben a mért koncentrációkban, a tumoros sejtvonalakkal szemben sem mutattak gátlást. A junkuzol és effuzol származékok értékeinek összehasonlítása alapján elmondható, hogy a metilcsoport megléte a C-6 atomon csökkentette a citotoxikus hatást.



## ÖSSZEFOGLALÁS

A PhD értekezés összefoglalja két *Juncus* faj, a *J. compressus* és *J. tenuis* fitokémiai vizsgálatával, valamint három természetes eredetű fenantrén, a junkuenin B, junkuzol és effuzol félszintetikus származékainak előállításával és vizsgálatával kapcsolatos eredményeinket. A vegyületek szerkezetmeghatározása spektroszkópiai vizsgálatok segítségével történt, az anyagok antiproliferatív hatásának vizsgálatát MTT módszerrel végeztük.

A száraz növényi nyersanyagokból kombinált kromatográfias módszerek alkalmazásával 12 vegyületet izoláltunk, köztük 10 fenantrént és 2 flavonoidot. Két komponens, a kompresszin A és B új természetes vegyületek. Valamennyi vegyületet elsőként izoláltuk a növényekből. A kompresszin A jelentős gátló hatást mutatott A2780 ( $IC_{50} = 13.19 \mu M$ ), a kompresszin B pedig HeLa sejtvonalon ( $IC_{50} = 1.86 \mu M$ ). Kísérleti eredményeink, valamint az irodalmi források alapján megállapítható, hogy a dimerképződés fokozhatja a fenantrének antiproliferatív hatását.

Junkuenin B-ből, junkuzolból és effuzolból kiindulva 15, nagy szerkezeti sokszínűséggel jellemezhető félszintetikus származékot állítottunk elő. A leghatásosabb junkuenin B származékok esetén az enantiomertiszta vegyületek farmakológiai hatását is vizsgáltuk. A **13c**, **16a** és **19a** jelzésű vegyületek bizonyultak a legaktívabbaknak a tesztelt sejtvonalakon [ $IC_{50} = 5.26 \mu M$  C33a sejtvonalon (**13c**),  $0.91 \mu M$  HeLa sejtvonalon (**16a**) és  $2.76 \mu M$  A2780 sejtvonalon (**18a**)]. A **16** és **19** jelzésű enantiomertiszta anyagok  $IC_{50}$  értékei alapján megállapítható, hogy ezen vegyületek esetén a (8a*R*) a legelőnyösebb konfiguráció az antiproliferatív hatás szempontjából. Továbbá ezek a vegyületek nem mutattak jelentős hatást az egészséges NIH/3T3 sejtvonalakon szemben a pozitív kontrollként alkalmazott ciszplatinnal.

A junkuzolból és effuzolból előállított félszintetikus analógok rendhagyó szerkezeti tulajdonságokkal rendelkeznek, mivel ezek a vegyületek a C-5a atomon szubsztituáltak. Az anyagok farmakológiai vizsgálata alapján elmondható, hogy az ebben a pozícióban kapcsolódó szubsztituensek nem fokozzák a kinoidális szerkezetű vegyületek antiproliferatív hatását. Ezt támasztja alá, hogy a vegyületek közül csak a **26** jelzésű esetén tapasztaltunk jelentős  $IC_{50}$  értékeket a tesztelt sejtvonalakon.

Eredményeink rámutatnak, hogy a Juncaceae növény család fajai ígéretes forrásai értékes biológiai aktivitással rendelkező fenantréneknek. Továbbá a Juncaceae fajokból izolált másodlagos anyagcseretermékek, különösen a fenantrének, különböző gyógyszerkutatási programok ígéretes kiindulási vegyületei lehetnek. A fenantrének félszintetikus átalakítása a kémiai diverzitás növelésén kívül hatásosabb vegyületek előállítását is eredményezheti.

#### AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Bús Cs**, Kúsz N, Jakab G, Senobar Tahaei A, Zupkó I, Endrész V, Bogdanov A, Burián K, Csupor-Löffler B, Hohmann J, Vasas A. Phenanthrenes from *Juncus compressus* Jacq. with promising antiproliferative and anti-HSV-2 activities.  
*Molecules* **2018**, 23, 2085–2093. **IF: 3.060**
- 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: 4.545**
- III. **Bús Cs**, Kulmány Á, Kúsz N, Gonda T, Zupkó I, Mándi A, Kurtán T, Tóth B, Hohmann J, Hunyadi A, Vasas A. Oxidized juncuenin B analogues with increased antiproliferative activity on human adherent cell lines: semisynthesis and biological evaluation.  
*Journal of Natural Products* **2020**, 83, 3250–3261. **IF: 3.779\***
- IV. **Bús Cs**, Kúsz N, Kincses A, Szemerédi N, Spengler G, Bakacsy L, Purger D, Berkecz R, Hohmann J, Hunyadi A, Vasas A. Antiproliferative phenanthrenes from *Juncus tenuis*: isolation and diversity-oriented semisynthetic modification.  
*Molecules* **2020**, 25, 5893–5907. **IF: 3.267\***

#### EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

- I. Szabados M, **Bús Cs**, Ádok-Sipiczki M, Kónya Z, Kukovecz Á, Sipos P, Pálkó I. Ultrasound-enhanced milling in the synthesis of phase-pure, highly crystalline ZnAl-layered double hydroxide of low Zn(II) content.  
*Particuology*, **2016**, 27, 29–33. **IF: 2.280**

\*2019. évi számítás alapján

## ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

1. **Bús Cs**, Kúsz N, Gonda T, Kulmány Á, Zupkó I, Tóth B, Hohmann J, Hunyadi A, Vasas A.  
Oxidised juncuenin B analogues with increased antiproliferative activity on human adherent cell lines: semisynthesis and biological evaluation.  
67<sup>th</sup> International Congress and annual meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA).  
Innsbruck, Ausztria, 2019. szeptember 1-5, pp. 18-19.
2. **Bús Cs**, Kúsz N, Csorba A, Jakab G, Csupor D, Hohmann J, Vasas A.  
Isolation and structure determination of phenanthrenes from *Juncus compressus*.  
The 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA); S-TCM 2018: The 11<sup>th</sup> Shanghai International Conference on Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine.  
Shanghai, China, 2018. augusztus 26-29, pp. 141-142.
3. **Bús Cs**, Kúsz N, Kulmány Á, Zupkó I, Tóth B, Hohmann J, Hunyadi A, Vasas A.  
A juncuenin B félszintetikus származékainak előállítása és a vegyületek antiproliferatív hatásának vizsgálata.  
Fiatal Gyógynövénykutatók Fóruma: a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Gyógynövény Szakosztályának tudományos konferenciája  
Gyógynövénykutató Intézet, Budakalász, 2018. november 30, pp. 13-14.
4. 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, 2018. június 8-9.
5. 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. Phytochemical Society of Europe  
Chieti, Italy, 2017. szeptember 17-20, Paper: OR26
6. **Bús Cs**, Kúsz N, Tóth B, Hohmann J, Vasas A.  
A *Juncus compressus* fitokémiai vizsgálata.  
Fiatal Gyógynövénykutatók Fóruma: a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Gyógynövény Szakosztályának tudományos konferenciája  
Gyógynövénykutató Intézet, Budakalász, 2017. május 12. Paper: A3