

**Magyar mohafajok fitokémiai és farmakológiai vizsgálata,
különös tekintettel a *Paraleucobryum longifolium*ra**

A doktori értekezés tézisei

Vollár Martin

Farmakognóziai Intézet
Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2023

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Farmakognózia Program
Programvezető: Prof. Hohmann Judit, a Magyar Tudományos Akadémia tagja

Farmakognóziai Intézet
Témavezető: Csupor Dezső DSc.

Vollár Martin

**Magyar mohafajok fitokémiai és farmakológiai vizsgálata,
különös tekintettel a *Paraleucobryum longifolium*ra**

A doktori értekezés tézisei

Komplex vizsga bizottság:

Elnök: Prof. Hohmann Judit DSc., a Magyar Tudományos Akadémiai tagja

Tagok: Janicsák Gábor PhD, Hunyadi Attila DSc.

Bíráló bizottság:

Elnök: Prof. István Szatmári DSc.

Bírálok: Alberti-Dér Ágnes PhD., Gonda Sándor PhD.

Tagok: Jójártné Laczkovich Orsolya PhD., Doró Péter PhD.

Szeged

2023

1 BEVEZETÉS

A növényvilágból a vaszkuláris növények fitokémiai és farmakológiai szempontból legjobban feltárt taxonok. A nem vaszkuláris növények közé tartozó, taxonómiaiilag az algák és a pteridofiták közé sorolt mohák azonban kevésbé tanulmányozottak. A tény, hogy a mohákat nem károsítják a rovarok, mikroorganizmusok, csigák és emlősök arra utal, hogy ezek a növények olyan bioaktív szekunder anyagcseretermékeket tartalmaznak, amelyeknek toxikus vagy repellens hatásuk van más fajokkal szemben. A fajok többségének farmakológiai profilja azonban nem ismert, intenzív kémiai és farmakológiai vizsgálatokat csak az utóbbi évtizedekben végeztek.

Több mint 20 000 faj tartozik a mohákhoz, amely magába foglalja a Marchantiophyta (májmohák, ~6000 faj), a Bryophyta (lombosmohák, ~14 000 faj) és az Anthocerotophyta (becősmohák vagy szarvasmohák, ~300 faj) osztályokat, amelyek a tengerek kivételével a világon mindenütt megtalálhatóak. A magyar flóra 659 fajt tartalmaz, túlnyomóan lombosmohákat (2 becősmoha, 146 májmoha, 511 lombosmoha).

Fitokémiai és farmakológiai szempontból a mohák a nehézkes gyűjtésük miatt kevésbé kutatottak. Mégis nagyszámú új vegyületet fedeztek fel belőlük, köztük több mint 40 új szénvázás terpenoidot és fenolos vegyületet. A mono-, szeszkvi-, di- és triterpének, flavonoidok, bibenzilek, acetogeninek a mohák leggyakoribb másodlagos anyagcseretípusai. Ezek a vegyületek érdekes biológiai aktivitást mutatnak, például rovarölő, citotoxikus, peszticid, izomrelaxáns, növényi növekedésszabályozó, HIV-ellenes, DNS-polimeráz β -gátló, elhízás elleni, neurotróf, antioxidáns, NO-termelés gátló, antimikrobiális és gombaellenes aktivitás.

Terápiás szempontból a mohák legperspektivikusabb bioaktivitásai a rákellenes és antibakteriális hatások. Számos nyers kivonatot és izolált vegyületet vizsgáltak mohákból különböző rákos sejtvonalakon citotoxikus aktivitás szempontjából. A terpenoidok és a bibenzilek tűnnek a leghatásosabb citotoxikus vegyületeknek, mivel számos gén és enzim aktiválásával apoptózist idézhetnek elő, azonban a hatás pontos mechanizmusa még mindig ismeretlen. A DNS fragmentáció, a sejtmag kondenzációja, a kaspázok aktiválása, az anti-apoptotikus nukleáris transzkripció faktor-kappaB gátlása, a p38 mitogén-aktivált protein kináz aktiválása szerepet játszhat az apoptotikus mechanizmusban.

A májmohák kémiaiilag különböznek a lombosmoháktól és a becősmoháktól, mivel az utóbbi két osztályban nincsenek olajtestek. A májmohákban a leggyakoribb másodlagos anyagcseretermékek a terpenoidok, különösen a szeszkvi- és diterpenoidok, amelyekből 40 év

alatt több mint 1600 vegyületet izoláltak, azonban ezek a vegyületek megtalálható egyes lombosmohákban is, köztük a *Mnium*, *Plagiomnium*, *Homalia*, *Plagiothecium* és *Taxiphyllum* fajokban, a becősmohákban pedig az *Anthoceros* fajokban.

A mohák antimikrobiális hatásáról szóló első leírás 1942-ben jelent meg. 1952-ben Madsen és Potes a *Sphagnum portoricense*, *Sphagnum strictum*, *Conocephalum conicum* és *Dumortiera hirsuta* fajok antimikrobiális hatásáról számolt be. 1959-ben egy tanulmány során, amelyben 12 mohafajt vizsgáltak, az *Anomodon rostratus*, az *Orthotrichum rupestre* és a *Mnium cuspidatum* figyelemre méltó antibakteriális hatását mutatott. 1979-ben egy átfogó tanulmányt tettek közzé, amelyben 52 mohafajt vizsgáltak 8 baktériumtörzsön; a vizsgált fajok 56%-a volt aktív legalább egy baktériumtörzssel szemben.

A magyarországi mohafajok többségét azonban még nem vizsgálták fitokémiai és farmakológiai szempontból. Ezek a fajok a (fito)kémiai tér egy felfedezetlen és eddig elhanyagolt szegletének tekinthetők.

2 CÉLKITŰZÉSEK

A mohák széles körben elterjedt etnomedicinális felhasználásuk ellenére az irodalomban kevés farmakológiai és kémiai adatot közölnek. Célunk a Kárpát-medencéből kiválasztott mohák kémiai összetételének és farmakológiai hatásainak feltárása volt. E cél megvalósítása érdekében a következő feladatokat végeztük el:

- kiválasztott mohafajok fitokémiai szűrése a leghatásosabb antiproliferatív és antimikrobiális hatással rendelkező fajok azonosítására,
- a lehetséges szekunder metabolitok azonosítása a szűrővizsgálatból származó leghatásosabb fajokból HRESIMS módszerrel,
- vegyületek izolálása a *Paraleucobryum longifolium*ból különböző kromatográfiás technikákkal (CC, VLC, GFC, FC, PLC, HPLC),
- az izolált vegyületek szerkezetének felderítése különböző spektrometriai módszerek használatával,
- az izolált vegyületek farmakológiai hatásának vizsgálata.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A fitokémiai szűrővizsgálathoz kiválasztott mohafajokat 2014 szeptemberében és októberében az Északi-középhegységben (Magyarország) gyűjtötte és azonosította Dr. Szűcs Péter. A *Paraleucobryum longifolium*ot Mátrafüreden (Magyarország) gyűjtötte és azonosította Dr. Szűcs Péter.

A fitokémiai szűrővizsgálatra szánt mintákat szárított, porított növényi anyagok metanolos extrakciójával állítottuk elő, amelyeket folyadék-folyadék kromatográfiával választottunk szét különböző polaritású oldószerek alkalmazásával.

A *Paraleucobryum longifolium*ból származó vegyületek izolálását több lépésben, különböző kromatográfiás módszerekkel végeztük, többek között nyílt oszlopkromatográfia (CC), vákuum folyadékkromatográfia (VLC), gélfiltrációs kromatográfia (GFC), flash kromatográfia (FC), preparatív rétegekromatográfia (PLC) és nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC) segítségével.

A fitokémiai szűrővizsgálatból származó lehetséges vegyületek azonosítása LC-MS szűréssel történt, a tisztított vegyületek szerkezetének felderítése főként NMR mérésekkel, valamint az ECD és ESI-HRMS spektrumok felvételével és kiértékelésével valósult meg. A *P. longifolium*ból izolált vegyületek szerkezetének meghatározásához 1D és 2D NMR technikát alkalmaztunk, amely magába foglalta a ^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC és EASY-ROESY méréseket. A HRESIMS technikát az izolált vegyületek pontos molekulatömegének mérésére és a fitokémiai szűrővizsgálatból származó lehetséges vegyületek szerkezet-felderítése céljából használtuk. ECD méréseket és sTDA ECD számításokat használtunk a vegyületek axiális kiralitásának meghatározására, a centrális kiralitás elemei pedig TDDFT-SOR számításokkal lettek kijelölve.

A kivonatok és a tisztított vegyületek antiproliferatív hatásának vizsgálatát 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid (MTT) teszttel végeztük humán méhnyak-(HeLa és SiHa), petefészek- (A2780) és emlőrák (T47D és MDA-MB-231) sejtvonalakon. A sejt kultúrákat 10% magzati szarvasmarha-szérummal, 1% nem esszenciális aminosavval és antibiotikum-antimikotikum keverékkel kiegészített minimum esszenciális médiumon (MEM) tenyésztettük. Referenciaanyagként ciszplatint használtunk.

A moha kivonatok antimikrobiális hatását 11 baktériumtörzsszel szemben vizsgáltuk korong-diffúziós módszerrel. A standard Gram-pozitív törzsek a következők voltak: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC

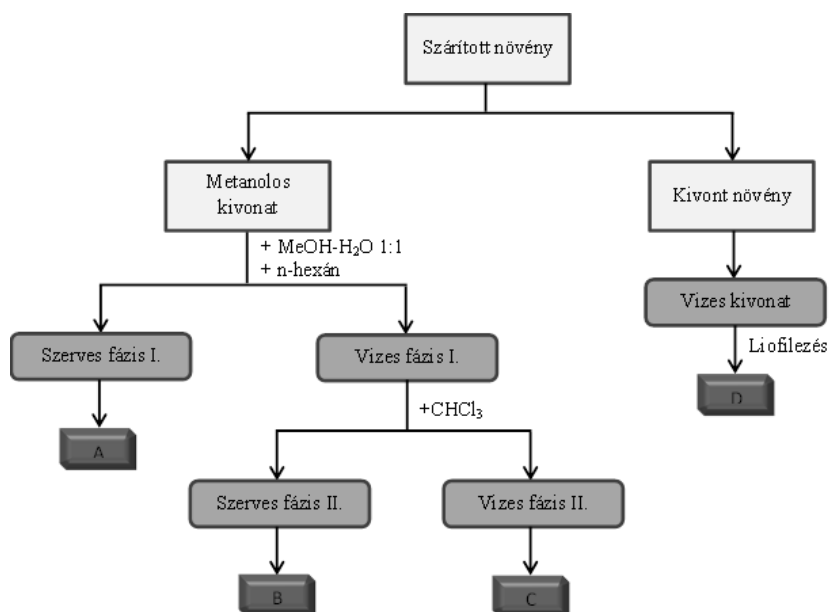
49619), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) és meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300). Standard Gram-negatívként az *Escherichia coli* (ATCC 35218), a *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) és a *Moraxella catarrhalis* (ATCC 43617) törzsek szolgáltak. A pozitív aktivitást 6 mm feletti gátlási zónaátmérő jelentette.

A farmakológiai vizsgálatokat a Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet (Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar) és az Orvosi Mikrobiológiai Intézet (Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar) együttműködésével végeztük.

4 EREDMÉNYEK

4.1 A magyar mohafajok fitokémiai szűrése

A 35 nemzetséghez és 20 családhoz tartozó 42 mohafajból összesen 168 kivonat készült n-hexánnal (A), klorforommal (B), vizes metanollal (C) és vízzel (D) (1. ábra).



1. ábra. A moha minták kivonása.

4.2 A kiválasztott mohák farmakológiai aktivitása fitokémiai szűréseken keresztül

4.2.1 Antiproliferatív vizsgálat

A vizsgálatban 41 fajból összesen 98 kivonat mutatott 10 g/mL koncentrációban >25%-os antiproliferatív gátlást legalább egy sejtvonallal szemben, és 17 fajból 25 kivonat mutatott több mint 50%-os gátlást legalább egy sejtvonalon 10 g/mL koncentrációban. Az eredményeket az 1. táblázat mutatja be. A kloroformos frakciók (B-kivonatok) mutatták a

legtöbb esetben a legerősebb aktivitást. Hat faj, nevezetesen a *Brachythecium rutabulum*, *Climacium dendroides*, *Encalypta streptocarpa*, *Pleurozium schreberi*, *Neckera besseri* és *Pseudoleskeella nervosa* rendelkezett egynél több aktív kivonattal. A *Paraleucobryum longifolium* kloroformos kivonata nemcsak a legmagasabb gátlással rendelkezett (78,54%-os gátlás a HeLa esetében 10 g/mL koncentrációban), hanem a vizsgált sejtvonalak mindegyikén mutatott aktivitást, kis különbséggel a 10 g/mL és 30 g/mL koncentrációk között.

A vizsgált családok közül a *Brachytheciaceae* (*Brachythecium rutabulum*, *Homalothecium philippeanum* és *Pseudoscleropodium purum*) és az *Amblystegiaceae* (*Amblystegium serpens* és *Hygroamblystegium tenax*) nyújtotta a legtöbb aktív kivonatot.

1. táblázat. Az antiproliferatív vizsgálatok eredményei. A rákos sejtek növekedését 25%-nál kisebb mértékben gátló kivonatok inaktívnak tekinthetők (piros), az 50%-os gátlást meghaladó értékek sárgától zöld színnel jelölve.

Fajok	A kivonat						B kivonat					
	HeLa		A2780		T47D		HeLa		A2780		T47D	
	10 µg/mL	30 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
<i>Abietinella abietina</i>	<25	<25	<25	<25	<25	32,26	30,00	38,62	<25	<25	42,99	48,97
<i>Amblystegium serpens</i>	<25	46,13	29,58	49,94	49,15	70,15	61,93	70,78	53,46	65,35	70,15	74,76
<i>Anomodon viticulosus</i>	26,96	50,72	<25	<25	<25	27,81	27,04	49,35	32,35	53,87	<25	36,32
<i>Atrichum undulatum</i>	<25	<25	<25	<25	<25	41,66	59,93	76,26	37,78	64,28	64,11	65,26
<i>Barbula unguiculata</i>	45,74	63,27	<25	<25	<25	34,14	65,46	75,11	<25	47,47	44,20	53,16
<i>Brachytheciastrum velutinum</i>	31,92	64,96	<25	35,58	<25	41,01	34,43	55,09	<25	61,29	34,43	51,51
<i>Brachythecium rutabulum</i>	53,49	61,64	25,04	34,93	45,40	55,36	51,95	53,89	<25	35,30	46,79	54,92
<i>Bryum argenteum</i>	47,79	80,09	<25	<25	<25	<25	36,11	54,52	<25	<25	35,95	41,26
<i>Bryum caespiticium</i>	30,37	57,84	<25	<25	<25	48,80	48,64	59,57	<25	<25	28,58	48,17
<i>Bryum moravicum</i>	<25	38,27	<25	<25	<25	29,73	46,72	62,09	27,34	48,22	40,64	59,69
<i>Calliergonella cuspidata</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	32,79	<25	<25	39,02	49,49
<i>Ceratodon purpureus</i>	<25	26,67	<25	32,49	<25	28,88	30,67	42,00	<25	35,18	<25	28,48
<i>Cirriphyllum piliferum</i>	51,34	67,39	<25	42,24	<25	31,19	<25	28,32	<25	<25	<25	<25
<i>Climacium dendroides</i>	52,79	63,79	<25	32,63	<25	<25	56,79	64,89	<25	<25	55,46	57,16
<i>Dicranum tauricum</i>	<25	<25	<25	28,55	<25	31,60	33,14	51,60	<25	48,94	35,38	54,93
<i>Encalypta streptocarpa</i>	76,66	61,32	34,04	87,90	25,72	44,08	54,46	72,90	73,72	80,12	33,22	33,27
<i>Funaria hygrometrica</i>	<25	39,84	<25	<25	<25	36,21	48,44	62,88	25,66	51,06	46,44	53,18
<i>Homalothecium lutescens</i>	<25	37,79	<25	31,59	<25	30,29	<25	<25	<25	<25	28,74	30,64
<i>Homalothecium philippeanum</i>	38,34	63,66	<25	40,77	37,39	48,19	46,93	73,77	33,60	74,93	63,90	62,51
<i>Hygroamblystegium tenax</i>	<25	51,08	<25	26,53	28,34	43,75	36,99	43,86	<25	<25	49,19	55,28
<i>Leskea polycarpa</i>	<25	29,00	<25	37,18	<25	25,71	<25	31,32	<25	35,02	<25	37,07
<i>Leucodon sciuroides</i>	26,00	43,88	<25	<25	<25	34,43	42,48	61,74	<25	<25	28,88	39,63
<i>Neckera besseri</i>	54,29	68,98	<25	<25	33,72	38,33	69,13	83,28	<25	76,48	50,07	68,26
<i>Orthotrichum diaphanum</i>	<25	28,22	<25	<25	<25	<25	40,19	51,75	25,04	50,65	35,43	40,61
<i>Oxyrrhynchium hians</i>	<25	50,41	<25	42,22	26,03	46,46	25,65	39,79	<25	28,61	34,01	46,64
<i>Paraleucobryum longifolium</i>	<25	27,34	<25	<25	<25	<25	78,54	83,93	63,23	78,03	46,84	56,87
<i>Plagiommium affine</i>	<25	41,79	<25	<25	<25	<25	42,41	55,53	<25	42,11	42,49	56,05
<i>Plagiommium cuspidatum</i>	39,13	39,44	26,49	97,60	<25	86,33	<25	<25	<25	56,15	<25	36,11
<i>Plagiommium rostratum</i>	26,01	60,72	<25	44,99	28,68	36,26	46,52	60,22	43,23	67,06	45,56	54,59
<i>Plagiommium undulatum</i>	35,77	33,42	<25	26,07	29,36	43,49	<25	<25	<25	33,21	<25	32,10
<i>Pleurozium schreberi</i>	61,85	93,41	41,15	37,25	<25	31,65	60,49	74,30	<25	36,89	29,26	43,95
<i>Pohlia nutans</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	29,51	49,60	<25	<25	<25	<25
<i>Polytrichastrum formosum</i>	<25	34,69	<25	<25	<25	28,85	<25	34,18	<25	<25	<25	<25

Fajok	A kivonat						B kivonat					
	HeLa		A2780		T47D		HeLa		A2780		T47D	
	10 µg/mL	30 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
<i>Porella platyphylla</i>	31,89	79,22	48,22	83,33	48,94	64,37	35,69	47,36	<25	41,93	29,33	47,86
<i>Pseudoleskeella nervosa</i>	68,43	75,64	<25	<25	38,94	43,69	61,71	71,88	<25	36,28	42,77	45,50
<i>Pseudoscleropodium purum</i>	<25	34,16	<25	<25	<25	<25	62,06	70,27	<25	28,01	53,88	54,58
<i>Rhytiadelphus squarrosus</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	43,99	53,66	<25	<25	40,31	51,65
<i>Rhytidium rugosum</i>	32,34	56,50	<25	36,29	<25	25,80	30,20	39,48	<25	<25	<25	27,52
<i>Schistidium crassipilum</i>	<25	33,32	<25	<25	<25	<25	27,52	53,09	<25	72,36	<25	38,36
<i>Syntrichia ruralis</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	27,05	33,02	<25	<25	30,49	39,25
<i>Thamnobryum alopecurum</i>	29,98	57,12	<25	26,75	<25	<25	34,35	53,87	<25	51,91	<25	<25
<i>Thuidium assimile</i>	<25	<25	<25	29,18	<25	<25	43,36	57,09	34,62	58,86	65,70	56,12
Fajok	C kivonat						D kivonat					
	HeLa		A2780		T47D		HeLa		A2780		T47D	
	10 µg/mL	30 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
<i>Abietinella abietina</i>	35,25	52,48	<25	<25	38,22	49,01	<25	<25	<25	<25	<25	30,04
<i>Amblystegium serpens</i>	33,19	44,83	<25	26,71	48,58	58,34	<25	<25	<25	<25	27,91	35,73
<i>Anomodon viticulosus</i>	<25	34,02	<25	<25	<25	27,47	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Atrichum undulatum</i>	29,14	41,65	<25	46,14	<25	37,95	33,37	36,14	<25	<25	<25	<25
<i>Barbula unguiculata</i>	29,68	35,91	<25	<25	<25	27,68	27,92	27,4	<25	<25	<25	<25
<i>Brachythecium velutinum</i>	<25	32,09	<25	<25	27,26	34,7	34,9	34,68	<25	<25	38,53	38,46
<i>Brachythecium rutabulum</i>	<25	34,26	<25	<25	<25	34,81	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Bryum argenteum</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Bryum caespiticium</i>	<25	35,57	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Bryum moravicum</i>	<25	37,94	<25	<25	<25	26,51	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Calliergonella cuspidata</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Ceratodon purpureus</i>	<25	<25	<25	<25	<25	31,86	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Cirriphyllum piliferum</i>	28,18	42,07	<25	<25	<25	26,85	<25	32,27	<25	<25	<25	<25
<i>Climacium dendroides</i>	<25	<25	<25	<25	<25	27,68	<25	27,42	<25	<25	27,38	37,52
<i>Dicranum tauricum</i>	<25	28,29	<25	<25	33,52	49,97	29,75	37,11	<25	<25	45,31	47,21
<i>Encalypta streptocarpa</i>	28,01	39,61	<25	<25	<25	32,5	27,05	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Funaria hygrometrica</i>	<25	<25	<25	<25	42,27	48,22	25,11	38,47	<25	<25	35,4	45,16
<i>Homalothecium lutescens</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	27,6
<i>Homalothecium philippeanum</i>	<25	33,51	<25	28,04	43,32	51	<25	<25	<25	<25	33,68	41,04
<i>Hygroamblystegium tenax</i>	26,66	38,22	<25	<25	52,69	55,03	<25	31,71	<25	<25	37,34	40,38
<i>Leskea polycarpa</i>	25,62	31,09	<25	<25	<25	34,12	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Leucodon sciuroides</i>	<25	29,98	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Neckera besseri</i>	37,13	41,25	<25	<25	54,5	55,63	<25	<25	<25	<25	32,28	43,28
<i>Orthotrichum diaphanum</i>	<25	40,79	<25	<25	<25	28,2	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Oxyrrhynchium hians</i>	<25	<25	<25	<25	<25	29,53	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Paraleucobryum longifolium</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Plagiommium affine</i>	42,04	50,67	<25	26,86	53,3	57,53	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Plagiommium cuspidatum</i>	35,49	46,35	<25	<25	33,53	45,9	<25	<25	<25	<25	<25	27,79
<i>Plagiommium rostratum</i>	40,44	51,65	<25	42,42	33,23	45,84	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Plagiommium undulatum</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Pleurozium schreberi</i>	<25	32,99	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Pohlia nutans</i>	<25	32,63	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Polytrichastrum formosum</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Porella platyphylla</i>	<25	41,69	<25	<25	<25	27,66	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Pseudoleskeella nervosa</i>	60,51	65,03	<25	26,27	49,89	54,5	<25	<25	<25	<25	<25	25,43
<i>Pseudoscleropodium purum</i>	<25	28,06	<25	<25	<25	31,29	<25	29,89	<25	<25	32,22	40,05
<i>Rhytiadelphus squarrosus</i>	<25	26,56	<25	<25	<25	33,78	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Rhytidium rugosum</i>	<25	33,67	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Schistidium crassipilum</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Syntrichia ruralis</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	30,83	41,17	<25	<25	57,42	59,35
<i>Thamnobryum alopecurum</i>	<25	31,9	<25	<25	<25	<25	26,26	40,68	<25	<25	<25	<25
<i>Thuidium assimile</i>	<25	<25	<25	34,23	29,78	43,24	<25	<25	<25	<25	32,28	44,58

4.2.2 Antimikrobiális vizsgálat

A 15 taxonból mindössze 19 minta mutatott mérsékelt antibakteriális aktivitást (**2. táblázat**). Egyik kivonat sem volt aktív a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, az *Escherichia coli* ATCC 35218 és a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ellen. A meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 és a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 törzsek voltak a legérzékenyebbek a vizsgált kivonatokra. A különböző polaritású frakciók közül a viszonylag apoláris n-hexános és kloroformos kivonatok mutattak antibakteriális aktivitást. A vizes és metanolos frakciók inaktívak voltak. A *Plagiomnium cuspidatum* mind a nyolc vizsgált törzsre volt aktív.

Amblystegium serpens, *Brachythecium rutabulum*, *Cirriphyllum piliferum*, *Climacium dendroides*, *Paraleucobryum longifolium*, *Plagiomnium affine*, és *Pseudoscleropodium purum* fajok mindkét vizsgálatban aktívak voltak.

2. táblázat. A mohakivonatok antibakteriális aktivitása (gátlási zónák milliméterben).

Fajok	Kivonat	MRSA	S.	S.	B.	S.	S.	S.	M.
		ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC
		43300	29213	12228	6633	19615	49619	13813	43617
<i>Amblystegium serpens</i>	B	—	—	—	—	—	—	—	9,0
<i>Brachythecium rutabulum</i>	B	9,0	9,0	—	—	—	—	—	—
<i>Calliergonella cuspidata</i>	A	—	7,3	—	—	—	—	—	—
	B	—	7,0	—	—	—	—	—	—
<i>Cirriphyllum piliferum</i>	B	—	—	—	—	—	7,0	—	—
<i>Climacium dendroides</i>	A	—	7,3	—	—	—	—	—	—
<i>Dicranum tauricum</i>	B	—	—	—	—	—	8,0	—	—
	A	8,6	8,6	—	—	—	—	—	—
<i>Oxyrrhynchium hians</i>	B	—	8,0	—	—	—	—	—	—
	A	8,6	8,6	—	—	—	—	—	—
<i>Paraleucobryum longifolium</i>	B	9,6	9,6	—	—	11,6	—	—	—
	A	9,6	9,6	—	—	11,6	—	—	—
<i>Plagiomnium affine</i>	B	—	—	—	8,0	—	8,5	—	—
<i>Plagiomnium cuspidatum</i>	A	11,3	10,7	9,0	9,0	10,0	12,0	10,0	10,0
	B	7,6	7,6	—	—	—	—	—	—
<i>Plagiomnium undulatum</i>	A	7,0	8,0	—	—	—	—	—	—
	B	—	8,0	—	—	—	—	—	—
<i>Pseudoscleropodium purum</i>	A	—	7,3	—	—	—	—	—	—
<i>Rhytidium rugosum</i>	B	—	—	—	7,5	—	8,0	—	7,5
<i>Schistidium crassipilum</i>	B	8,0	7,0	—	9,0	—	11,5	—	7,7

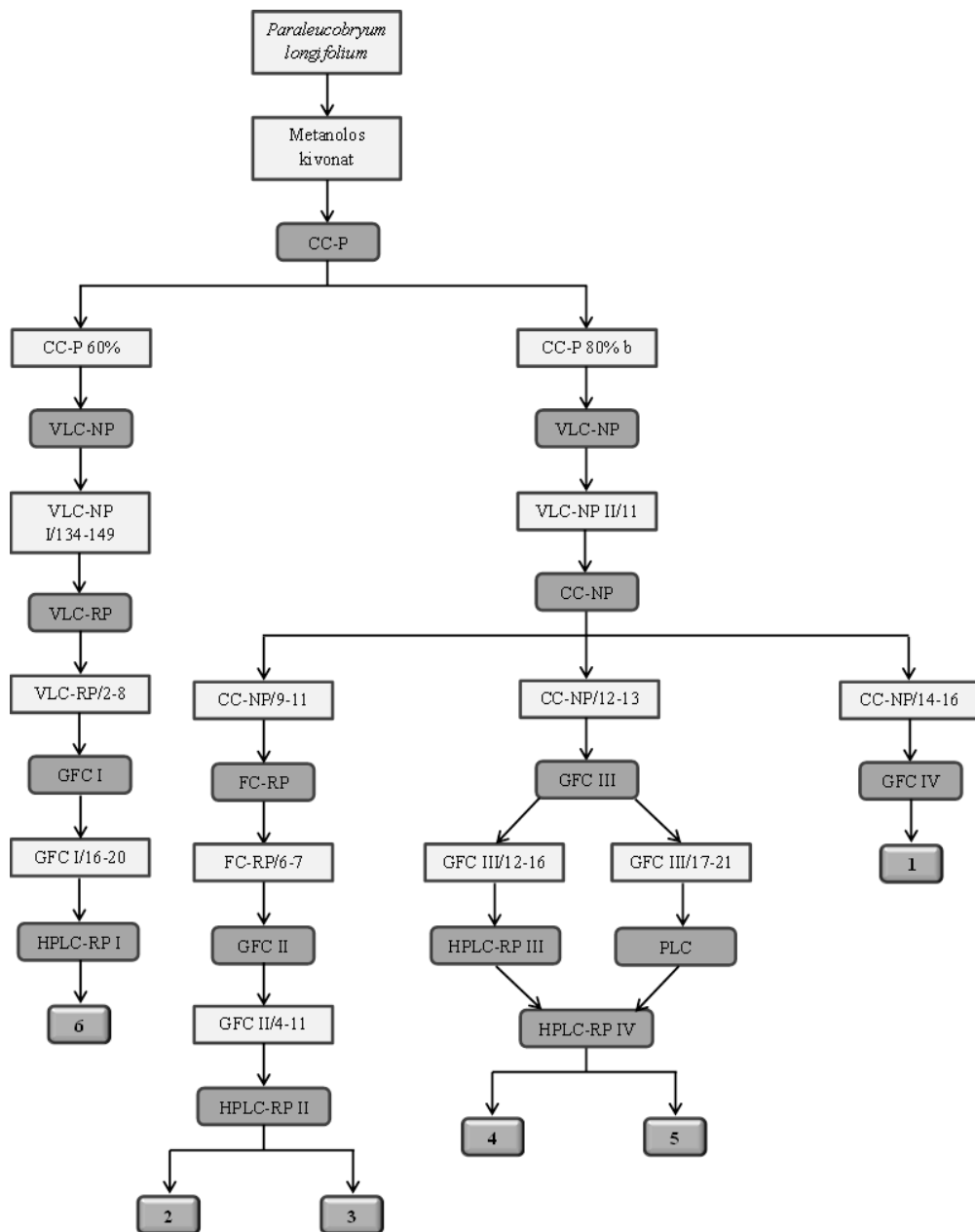
4.2.3 MS analízis

Célunk a legaktívabb kivonatokból a jellegzetes vegyületeket azonosítása volt. A kinyert MS² csúcsok listáját az msConvert program segítségével szöveges fájlba konvertáltuk, és a tömegspektrumok adatszűréséből származó 100 legintenzívebb csúcs került kiválasztásra az MS² azonosításhoz a KEGG kismolekulás adatbázisában, a MetFrag online keresőeszköz segítségével. A találatokat manuálisan szűrtük legalább 80%-os egyezés alapján, ha az azonos MS² fragmentumcsúcsok száma legalább öt volt. A 8 fajból 22 vegyületet azonosítottunk.

4.3 Szekunder metabolitok izolációja

4.3.1 Szekunder metabolitok izolálása *P. longifolium*ból

Az antiproliferatív és antimikrobiális vizsgálatokban mutatott rendkívül erős hatásai miatt a *Paraleucombryum longifolium*ot választottuk ki további vizsgálatokra. A növényi anyagot szobahőmérsékleten metanollal perkolátorban extraháltuk és bepároltuk. Többlépcsős kromatográfiás módszerekkel, mint például CC, VLC, GFC, FC, PLC és HPLC (**2. ábra**), egy ismert flavonoid glikozidot, nevezetesen a diosmetin 7-*O*-[2,4-di-*O*-(α -L-ramnopiranozil)]- β -D-glükopiranozidot (**6**) izoláltunk, valamint öt új 9,10-fenantrokinon dimert, melyek a leukobrin A (**1**), a leukobrin B (**2**), a leukobrin C (**3**), a leukobrin D (**4**) és a leukobrin E (**5**) nevet kapták, és amelyeket az irodalomban most először írtak le.



2. ábra. Vegyületek izolálása a *P. longifolium*ból

4.4 A *P. longifolium*ból izolált vegyületek farmakológiai hatása

Az izolált természetes vegyületek (leukobrin A-E) antiproliferatív hatását négy növénygyógyászati eredetű humán rákos sejtvonalal szemben határoztuk meg két viszonylag magas koncentrációban (30 és 60 μM). A leukobrin A 60 μM -nál közel 70%-os vagy annál nagyobb mértékű gátlást gyakorolt a sejtnövekedésre, és a számított IC50-értékek jelentősen magasak voltak (40-50 μM). A leukobrin B még gyengébb sejtnövekedés gátló hatást váltott ki. Az összes többi vegyület 60 μM koncentrációig nem fejtett ki releváns hatást a rákos sejtekre (3. táblázat). Mivel a gyakran használt referenciaanyagok (pl. ciszplatin) jóval kifejezettebb

antiproliferatív hatást váltanak ki alacsony mikromoláris IC₅₀ értékekkel, a most bemutatott természetes vegyületeknek ez a tulajdonsága mérsékeltnek (leukobrin A és B) vagy elhanyagolhatónak (leukobrin C, D és E) tekinthető.

3. táblázat. A leukobrinok antiproliferatív hatása emberi rákos sejtvonalakkal szemben

Vegyület	Konc.	Gátlás (%) ± SEM			
		[számított IC ₅₀ (µM)]			
		SiHa	HeLa	A2780	MDA-MB-231
Leukobrin A	30 µM	22,47 ± 1,56	25,69 ± 1,88	–*	–
	60 µM	69,34 ± 1,14	80,41 ± 2,20	86,43 ± 0,46	76,04 ± 0,61
		[45,56]	[40,40]	[46,34]	[50,81]
Leukobrin B	30 µM	–	10,72 ± 2,85	–	–
	60 µM	22,44 ± 0,69	37,48 ± 2,03	16,38 ± 2,44	59,80 ± 0,71
Leukobrin C	30 µM	–	–	–	–
	60 µM	–	31,63 ± 1,36	–	–
Ciszplatin	10 µM	88,64 ± 0,50	42,61 ± 2,33	83,57 ± 1,21	67,51 ± 1,01
	30 µM	90,18 ± 7,78	99,93 ± 0,26	95,02 ± 0,28	87,75 ± 1,10
		[7,84]	[12,43]	[1,30]	[3,74]

4.5 Az izolált vegyületek szerkezetének meghatározása

Az **1** jelzésű vegyület molekulaképlete a HRESIMS adatok alapján C₄₀H₃₈O₁₂, amelyhez a [M+Na]⁺ m/z 733,2252 molekulaion tartozott. A ¹³C JMOD spektrum alapján az **1** jelzésű vegyület egy szimmetrikus dimer. A HMBC korrelációk feltárták, hogy az **1** jelzésű vegyület 9,10-fenantréndion alapvázat tartalmaz. Összességében elmondható, hogy a leukobrin A névre keresztelt **1** jelzésű vegyület dimer szerkezetű, amelyben a monomerek a C-8 atomjaikon keresztül kapcsolódnak egymáshoz.

A **2** jelzésű vegyület (leukobrin B) molekulaképlete C₅₀H₅₄O₁₂-ként lett meghatározva HRESIMS alapján, [M+Na]⁺ m/z 869,3505 molekulaion tömeggel. Hasonlóan az **1** jelzésű vegyülethez a ¹H NMR és ¹³C JMOD spektrumok szintén szimmetrikus dimer szerkezetre utaltak és nagy hasonlóságot mutattak az **1** jelzésű vegyület spektrumához. Különösen a 9,10-fenantréndion rész ¹H és ¹³C kémiai eltolódásai voltak közel az **1** vegyület spektrumhoz. A fő különbségek a C5 prenil oldalláncban voltak, amely a **2** jelzésű vegyületben C10 részre változott.

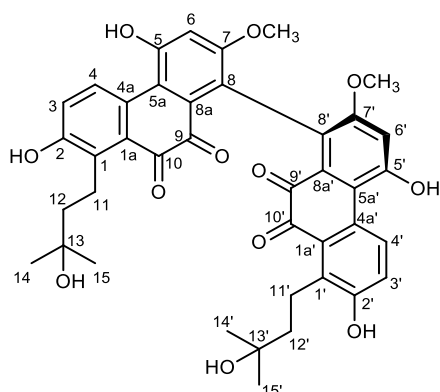
A **3** jelzésű vegyület (leukobrin C) molekulaképlete **2** jelzésű vegyülethez hasonlóan C₅₀H₅₄O₁₂, [M+Na]⁺ m/z 869,3507 molekulaion tömeggel. A **2** és **3** jelzésű vegyületek 1D és

2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR karakterisztikái hasonlóak voltak, közöttük csak csekély eltérések mutatkoztak. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a szerkezeti különbségek a vegyületek sztereokémiájával magyarázhatók.

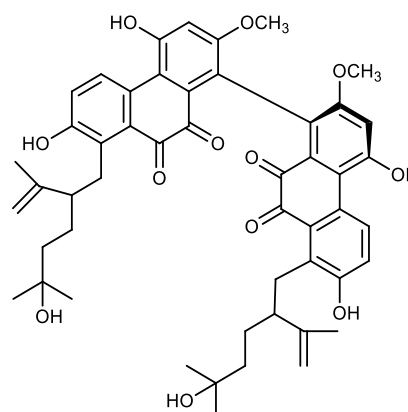
A **4** jelzésű vegyület (leukobrin D) HRESIMS adatai $\text{C}_{45}\text{H}_{46}\text{O}_{12}$ molekulaképletet mutattak ki m/z 801,2876 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ nátriumion addukt értéke alapján. A ^1H NMR és ^{13}C JMOD adatok az **1** és **2** jelzésű vegyületek rezonanciáihoz hasonló jeleket tartalmaztak, ami arra utal, hogy a **4** jelzésű vegyület az **1** és **2** vegyület monomer részeiből felépített heterodimer. Az **1** és **2** vegyülethez hasonlóan a **4** vegyület monomer alkotórészei a C-8 atomjaikon keresztül kapcsolódnak.

Az **5** jelzésű vegyület (leukobrin E) esetében minden HRESIMS és NMR jellemző nagymértékben hasonlított a **4** jelzésű vegyületéhez, ami arra utal, hogy egy azonos 2D szerkezetű, de eltérő kiralitású molekulapárról van szó.

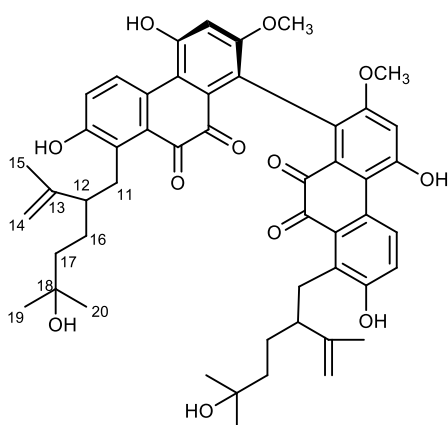
A **6** jelzésű vegyület diosmetin $7-O$ -[2,4-di- O -(α -L-ramnópiranozil)]- β -D-glükópiranozidként lett azonosítva.



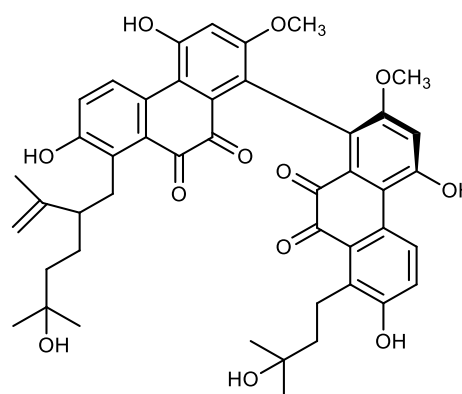
leukobrin A



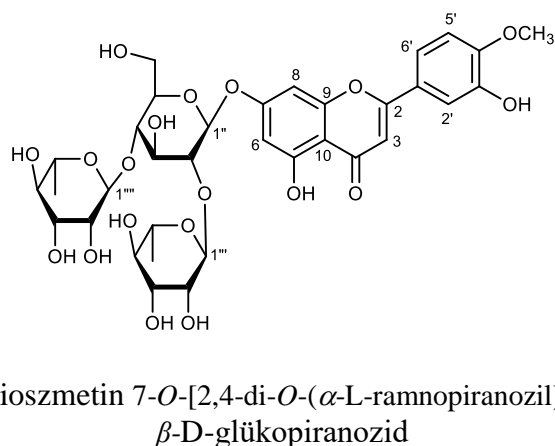
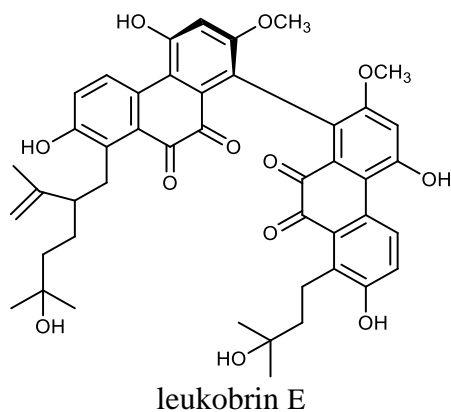
leukobrin B



leukobrin C



leukobrin D



5 ÖSSZEFOGLALÁS

Célkitűzésünk a Kárpát-medencéből származó mohafajok szűrése volt kémiai és farmakológiai szempontból, valamint a *P. longifolium* további vizsgálata különböző kromatográfias módszerekkel aktív vegyületek azonosítása érdekében.

Antiproliferatív MTT-teszteket végeztünk humán méhnyakrák (HeLa és SiHa), petefészek (A2780) és emlőrák (T47D és MDA-MB-231) sejtvonalakon. Az antimikrobiális aktivitást korong-diffúziós módszerrel határoztuk meg Gram-pozitív és Gram-negatív törzseken. Az eredmények alapján a Kárpát-medencében gyűjtött 42 mohacsalád 168 kivonatának vizsgálatából összesen 41 faj 98 kivonata mutatott legalább 25%-os gátlást legalább egy a rákos sejtvonal proliferációjában, és 17 fajból származó 25 kivonat több mint 50%-os gátlást mutatott legalább az egyik sejtvonalon 10 g/mL koncentrációban. A legnagyobb gátlást a *P. longifolium* kloroformos kivonata eredményezte. A korong-diffúziós vizsgálatban csak 15 taxon mutatott mérsékelt antibakteriális hatást, közülük a *Plagiomnium cuspidatum* bírt legnagyobb aktivitással nyolc baktériumtörzs gátlása révén. Az *Amblystegium serpens*, *Brachythecium rutabulum*, *Cirriphyllum piliferum*, *Climacium dendroides*, *Paraleucobryum longifolium*, *Plagiomnium affine* és *Pseudoscleropodium purum* fajok mindkét vizsgálatban aktívak volt.

A farmakológiai szűrővizsgálatok alapján a *Paraleucobryum longifolium*ot választottuk ki részletes fitokémiai elemzésre. A *P. longifolium* kivonatából hat vegyületet izoláltunk CC, VLC, GFC, PLC, HPLC technikák alkalmazásával. Az azonosítás és szerkezetmeghatározás 1D és 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC és EASY-ROESY kísérletek), HRMS és ECD segítségével történt.

Ez volt az első alkalom, hogy a *P. longifolium*ból komplex szekunder metabolitokat írtak le. Összesen 5 korábban ismeretlen, prenil-szubsztituált 8,8'-kapcsolatos 9,10-fenantrénkinon-dimert (leucobryns A-E) és 1 flavonoid-glikozidot (dioszmetin 7-O-[2,4-di-O-(α -L-rhamnopyranozil)]- β -D-glükopiranozid, amelyet korábban a *Dicranum scoparium*ból írtak le) izoláltunk ebből a fajból. Bár a fenantrének a mohák specifikus pigmentjei, a leukobrinok az első olyan természetes előfordulású 9,10-fenantrénkinon-dimerek, amelyekben a monomerek C-8 kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. A természetben a 9,10-fenantrénkinon-monomerek is ritkán fordulnak elő, amelyek antibakteriális és antivirális aktivitással rendelkeznek.

A leukobrinok antiproliferatív hatását *in vitro* vizsgáltuk. A leukobrin A és B mérsékelt gátlást, míg a leukobrin C-E elhanyagolható hatást mutatott. Ezek a nagyon különböző molekulák további átfogó farmakológiai vizsgálatot érdemelnek.

6 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni legnagyobb köszönetemet Dr. Csupor Dezsőnek, hogy felbecsülhetetlen szakmai tudásával vezette doktori munkámat, és végigkísért a tudományos élet útján.

Mélyen hálás vagyok Hohmann Judit professzor asszonynak, a Farmakognóziai Intézet korábbi vezetőjének, hogy minden lehetőséget biztosított számomra a kísérleti munkához.

Köszönettel tartozom Dr. Szűcs Péter és Dr. Marschall Marianna részére a növényi anyagok azonosításáért és gyűjtéséért, Prof. Hohmann Juditnak és Dr. Kúsz Norbertnek az NMR mérésekért, Dr. Kövér E. Katalinnak és Csorba Attilának az LC-MS mérésekért, Dr. Csupor-Löffler Boglárkának az antibakteriális vizsgálatokért, Prof. Zupkó Istvánnak és Seyyed Ashkan Senobar Tahaei-nak az antiproliferatív vizsgálatokért, valamint Prof. Kurtán Tibornak és Dr. Mándi Attilának az ECD mérésekért.

Hálás vagyok Dr. Stefkó Dórának is, hogy életem ezen szakaszában támogatott.

Hasonlóképpen köszönettel tartozom a Farmakognóziai Intézet valamennyi munkatársának. Külön köszönöm Horváth Attilának, Dr. Zomborszki Zoltánnak, Dr. Kiss Tivadarnak, Horváth-Boros Klárának, Dr. Kerekes Diánának, Dr. Kovács Balázsnak és Dr. Javad Mottaghipishehnek a barátságot és a tudományos munkám támogatását. Külön köszönetet szeretnék mondani szüleimnek, testvéremnek, rokonaimnak és barátaimnak. Az ő támogatásuk nélkül nem tudtam volna elvégezni ezt a munkát.

Az értekezés a következő publikációkon alapul:

- I. **Martin Vollár**, András Gyovai, Péter Szűcs, István Zupkó, Marianna Marschall, Boglárka Csupor-Löffler, Péter Bérdi, Anikó Vecsernyés, Attila Csorba, Erika Liktör-Busa, Edit Urbán, Dezső Csupor
Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Selected Bryophytes
Molecules, 2018, 23(7): 1520 **IF: 3,06**

- II. Dezső Csupor, Tibor Kurtán, **Martin Vollár**, Norbert Kúsz, Katalin Kövér E., Attila Mándi, Péter Szűcs, Marianna Marschall, Seyyed Ashkan Senobar Tahaei, István Zupkó, Judit Hohmann
Pigments of the Moss Paraleucobryum longifolium: Isolation and Structure Elucidation of Prenyl-substituted 8,8'-linked 9,10-Phenanthrenequinone Dimers
Journal of Natural Products, 2020, 83(2): 268-276 **IF: 4,05**

További publikációk:

- III. **Martin Vollár**, Gábor Feigl, Dóra Oláh, Attila Horváth, Árpád Molnár, Norbert Kúsz, Attila Ördög, Dezső Csupor, Zsuzsanna Kolbert
Nitro-Oleic Acid in Seeds and Differently Developed Seedlings of Brassica napus L.
Plants (Basel), 2020, 9(3): 406

- IV. Ferencz, Elek, Spengler, Gabriella, Zupkó, István, **Vollár, Martin**, Zomborszki, Zoltán Péter, Kúsz, Norbert, Hohmann, Judit, Kovács, Balázs, Csupor, Dezső, Laczkó-Zöld, Eszter; Csupor-Löffler, Boglárka
Isolation of compounds from the roots of Ambrosia artemisiifolia and their effects on human cancer cell lines
Zeitschrift für Naturforschung C, 2023, 78(7-8):299-305