

Zárójelentés

A projekt célja olyan természetes eredetű vegyületek kimutatása, jellemzése, azonosítása volt, melyek antimikrobiális hatást mutatnak növényi és/vagy humán kórokozókkal szemben. A cél megvalósításához a növényi minták 2010 nyarától botanikai (kemotaxonómiai) megfontolások, valamint népgyógyászati megfigyelések alapján lettek gyűjtve, melyekből biológiai aktivitás alapján kiszűrtük az ígéreteseket. A gyűjtött növények leveléből, szárából, virágából és gyökeréből kivonatokat készítettünk különböző oldószerek (hexán, acetón, etil-acetát, metanol, 50% etanol, víz) felhasználásával, vagy illóolajat készítettünk vízgőz desztillációval. Az antibakteriális hatás kimutatására vékonyréteg-kromatográfiához csatolt biológiai értékelést (direkt bioautográfia) használtam, mely alkalmas nemcsak az összkivonatok, de azok egyes komponenseinek a vizsgálatára is. Laborunkban direkt bioautográfiahoz a kezdetekben *Bacillus subtilis* talaj baktériumot és lumineszkáló génmódosított *Pseudomonas savastanoi* pv. *maculicola* *Arabidopsis* növénypatogént alkalmaztunk, de a teszt mikroorganizmusok körét a projekt folyamán bővítettük természetes lumineszcens mélytengeri *Aliivibrio fischeri* (*Vibrio fischeri* was renamed), paprika (*Capsicum annuum*) patogén *Xanthomonas euvesicatoria* valamint burgonya és paradicsom patogén *Ralstonia solanacearum* (karantén kórokozó Magyarországon) baktériumokkal. Kooperációban humán patogén baktériumokat is alkalmaztunk.

A projekt eredményeinek tekinthetők az elválasztástechnikai módszerek fejlesztése, mint pl. analitikai és preparatív OPLC-s, flash kromatográfiás, analitikai és preparatív HPLC-s elválasztások kidolgozása, valamint a biológiai aktivitás irányította izolálási rendszer kiépítése.

Az *Asteraceae* családból gyűjtött 20 növényfajból (orvosi székfű (*Matricaria recutita*), közönséges, magas és kanadai aranyvessző (*Solidago virgaurea*, *S. gigantea* és *S. canadensis*), útszéli bogáncs (*Carduus acanthoides*), orvosi székfű (*Matricaria recutita*), ékes keserűgyökér (*Picris hieracioides*), vastövű imola (*Centaurea scabiosa*), közönséges napraforgó (*Helianthus annuus*), szárnagybogáncs (*Onopordum acanthium*), fehér szárnagygyökér (*Echinops sphaerocephalus*), közönséges bojtorján (*Arctium lappa*), közönséges cickafark (*Achillea millefolium* L.), sédkender (*Eupatorium cannabinum*), gilisztaüző varádics (*Chrysanthemum vulgare*), tavaszi aggófű (*Senecio vernalis*), réti imola (*Centaurea jacea*), útszéli imola (*Centaurea biebersteinii* DC.), borzas imola (*Centaurea indurata* Janka) százszorszép (*Bellis perennis*)) több is alkalmasnak mutatkozott további vizsgálatra. Ezekon kívül a vérehulló fecskefű (*Chelidonium majus*), a közönséges orbáncfű (*Hypericum perforatum*) és különféle illóolajok komponenseit is vizsgáltuk.

A kiválasztottak közül a kamillát módszerfejlesztésre, izolálási lépések kidolgozására is alkalmaztuk, amely esetében az 50% etanosos valamint a metanosos kivonat mutatkozott a leggazdagabbnak antibiotikus hatású anyagokra nézve.

A biológiai aktivitás irányította izolálások során az elválasztási, tisztítási és izolálási lépések után a kapott frakciókat, anyagokat direkt bioautográfiával monitoroztuk, hogy kizárhassuk az inaktívakat. Elválasztásra az alábbi technikákra dolgoztunk ki módszereket: hagyományos rétegekromatográfia (TLC), preparatív TLC, off-line túlnyomósos rétegekromatográfia (OPLC), kevert módú OPLC-re (off-line mintafelvétel és on-line detektálás, frakciószedés), preparatív OPLC, flash kromatográfia és preparatív nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC).

OPLC-vel on-line detektálás és frakcionálás segítségével izolált antibiotikus hatású kamilla komponenseket GC-MS-sel azonosítottuk. A cisz- és transz-spiroéter, valamint a herniarin mutattak gátló hatást *P. maculicola* és *B. subtilis* baktériumokkal szemben, míg az umbelliferon csak a *P. maculicola*-t gátolta (Móricz et al. 2012 MedChem). *Aliivibrio fischeri*vel szemben vizsgálva a kamilla komponenseket, a rétegről leoldott antibakteriális anyagokat, a cisz- és transz-spiroétert, a herniarint és az alfa-bizabololt SPME-GC-MS-sel azonosítottuk (Móricz et al. 2012 JPC).

A kamilla további aktív anyagainak izolálására tovább lett fejlesztve az OPLC módszer. Egyrészt be lett vezetve a preparatív OPLC (0,5 mm vastagságú réteg alkalmazásával), másrészt egy oszlopos minta előkészítésen túl egy a rétegen való *in situ* mintatisztítást is végeztünk, amely során a nem kívánatos anyagokat ellenkező irányban lemostunk a rétegről még izolálás előtt, csökkentve ezzel a réteg terhelését. A mintatisztítás utáni frakcionálás lépcsős gradienssel történt. Az antibakteriális hatású frakciók (direkt bioautográfiával vizsgáltam *Pseudomonas maculicola* és *Aliivibrio fischeri* baktériumokkal szemben) GC-MS és LC-MS/MS vizsgálata egyrészt a már korábban általunk leírt anyagokat, valamint más flavonoidokat, fenolos vegyületeket és zsírsavakat mutatott ki. Az OPLC-s frakcionálás végén a rétegen maradt aktív anyagok m/z értéke OPLC-MS-sel lett vizsgálva (TLC-MS interface segítségével) (Mincsovcics et al. 2013 JPC és Móricz et al. 2013 J AOAC Int).

A kamilla fő aktív anyagai közül az alfa-bizabolol és a spiroéterek mutattak gátló hatást a paprika (*Capsicum annuum*) kórokozó *Xanthomonas vesicatoria* baktériummal szemben (Móricz et al. 2014 CBS, Móricz et al. 2015 J AOAC Int).

A főbb hatóanyagok, mint a cisz-spiroéter, a kumarin származék herniarin és umbelliferon, valamint az alfa-bizabolol gátló hatása luminométer segítségével is bizonyítva lett oldatfázisban *P. maculicola* és *Aliivibrio fischeri* baktériumokkal szemben (Móricz et al. 2015 J AOAC Int).

Kamilla antibakteriális anyagait BioAréna rendszerben vizsgálva, a formaldehid befogó anyagok csökkentették, míg a formaldehid generáló anyag növelte a gátló zónák méretét, amiből feltételezhető, hogy a formaldehidnek szerepe van az anyagok hatásmechanizmusában (Móricz et al. 2015 J AOAC Int).

A kumarin származékok gombaellenes hatását tovább vizsgáltam *in vivo* bab-babrozsda (*Uromyces phaseoli*) rendszerben. A direkt védelmet (kezelés a fertőzés után) 10^{-3} , 10^{-4} és 10^{-5} mol/l koncentrációnál vizsgáltam, míg az immunizálásnál decimálisan hígított oldattal (10^{-3} - 10^{-23} mol/l) előkezelttem a babokat 3 nappal a fertőzés előtt. A spóratelemek számának csökkenését figyeltem meg a direkt hatás vizsgálatánál: herniarinnál a legnagyobb

koncentrációnál szinte tünetmentesek lettek a növények, csak elszórtan alakult ki 1-1 spóratelep, s a legkisebb koncentrációnál is 50%-nál nagyobb visszaszorítást tapasztaltam; az umbelliferon a legnagyobb koncentráció is csak kb. 50%-ban csökkentette a telepek számát, s a koncentráció csökkenésével egyre kisebb hatással bírt. Az immunizálásnál a Tyihák Ernő által már korábban leírt 4-es immunválaszt tapasztaltam, azaz 4 különböző koncentrációnál körülbelül azonos mértékű csökkenést tapasztaltam a spóratelepek számában. A 100% kontrollhoz képest 30-50 %-osnak adódott a fertőzöttség, s a herniarin hatásosabbnak bizonyult.

Kamilla és közönséges cickafark tinktúrában apigenint és linolénsavat azonosítottunk LC-MS/MS-sel, mint antibakteriális komponensek. A linolénsav gátolta a *B. subtilis*, a humán patogén *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* és *Escherichia coli*, valamint a növény kórokozó *X. euvesicatoria* és az *A. fischeri* baktériumokat (Jesionek et al. 2014 HPTLC2014). Szintén LC-MS/MS-sel azonosítottuk a közönséges orbáncfű kivonatában talált antibakteriális anyagokat, amelyek polifenolos vegyületeknek (apigenin, 3,8'-biapigenin, quercetin, kaempferol), illetve zsírsavnak (linolénsav) mutatkoztak (Jesionek et al. 2015 J AOAC Int).

Az OPLC-direkt bioautográfia rendszert sikeresen alkalmaztuk 2, a piacon kapható kakukkfű (*Thymus vulgaris*) illóolajban található antibakteriális hatású anyagok kimutatására és frakcionálására. GC-MS-sel azonosítottuk az izolált aktív anyagokat, amelyek az alábbiak voltak: timol, karvakrol, linalool, alfa-terpineol, és az egyikben a mesterséges, elsősorban lágyítóként alkalmazott dietil-ftalát (Moricz et al. 2012 Chromatographia, Tyihák et al. 2012 JCA). Desztillációval nyert oregánó (*Origanum onites*) illóolaj timol és karvakrol komponensei antimikrobiális hatást mutattak gomba kórokozókkal (*Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae*, *C. gloeosporioides*) és *B. subtilis*-szal szemben is direkt bioautográfiai vizsgálatokban. A BioArénás vizsgálatok eredménye azt mutatja, hogy az antibakteriális hatásban szerepet játszhat a formaldehid, ugyanis a formaldehid befogó L-arginin csökkentette a gátló zónát, míg a formaldehid generátor réz ionok növelték (Altintas et al. 2013 J AOAC Int).

Más, kereskedelemben kapható olajat is vizsgáltunk direkt bioautográfiával *A. fischeri*, *P. maculicola*, *B. subtilis* és *X. evesicatoria* baktériumokkal szemben, úgy mint eukaliptusz (*Eucalyptus globulus* Labill.), teafa (*Melaleuca alternifolia* (Maiden et Betche) Cheel), szegfűszeg (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry), fahéj (*Cinnamomum ceylanicum* Nees.), édeskömény (*Foeniculum vulgare* Mill.), rozsmaring (*Rosmarinus officinalis* L.), fodormenta (*Mentha spicata* L.) és muskotályzsálya (*Salvia sclarea* L.) illóolajat. Az olajok főbb komponensei (terpinén-4-ol, eukaliptol, eugenol, trans-fahéjaldehid, szklareol, linalool, linalil-acetát, karvon, transz-anetol és eukaliptol) s néhány minorkomponens is gátló hatást mutatott a legtöbb alkalmazott baktériummal szemben (Móricz et al. 2013 ISEO, Horváth et al. 2013 JPC, Móricz et al. 2015 JPC).

A vékonyrétegen való detektálás érzékenyítésére módszertani újítást dolgoztunk ki, melynek alkalmazhatóságát bizonyítottuk a kakukkfű komponenseinek UV denzitometriás és direkt bioautográfiai (luminescens *P. maculicola*) detektálásánál. Off-line infúziós OPLC-vel választottuk el a kakukkfű komponenseit előmosott szilikagél rétegen, majd az anyagokat

tartalmazó sávot 2 oldalról acetonitrillel összenyomtuk. Ezzel a denzitometriás csúcsok jel/zaj arányát jelentősen tudtuk növelni (a csúcsok magasabbak lettek), s így a kimutatási határt csökkenteni. Direkt bioautográfiás kimutatás esetében a minor komponens linalool antibakteriális hatása csak az eljárás után vált láthatóvá, a foltban a linalool mennyisége csak így érte el a minimum gátló koncentrációt a réteg túlzott terhelése nélkül (Mincsovics et al. 2013 Balaton Symp).

A vérehulló fecskefű antibakteriális hatású anyagai, amelyeket preparatív rétegekromatográfiához csatolt direkt bioautográfia segítségével detektáltam és izoláltam, majd azonosításuk LC-Q/TOF technikával történt. 11 *B. subtilis* baktériumot gátló alkaloidot azonosítottam (kelidonin, szanguinarin, keleritrin, berberin, koptizin, koridin, dihidroszanguinarin, dihidrokeleritrin, 6-acetonil- dihidroszanguinarin, 6-acetonil- dihidrokeleritrin és sztilopin.), melyek közül 3 (kelidonin, szanguinarin, keleritrin) aktív volt *E. coli* baktériummal szemben is (Móricz et al. 2015 Chromatographia).

A számbogáncs, a gilisztaűző varádics és a közönséges napraforgó több komponense is gátolta a vizsgált növényi kórokozókat. A számbogáncs és a közönséges napraforgó komponenseit humán patogén baktériumokkal szemben is teszteltük. A kitüntetett növénykomponenseim nagy része aktívnek bizonyult meticillin rezisztens *Staphylococcus Aureus* 4262 (beteganyagból izolált törzs), *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922, és *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ellen.

A gilisztaűző varádics és a közönséges napraforgó kivonatainak aktív anyagait HPTLC-MS interface-ESI-MS és HPTLC-DART-MS/MS technikákkal, s a napraforgóét LC-TOF-fal is vizsgáltam. Ezen aktív anyagok UV, MS és MS/MS spektrumainak értelmezéséhez további spektroszkópiai vizsgálatok folyamatban vannak (Móricz et al. 2014 HPTLC2014).

Az üvegházunkban ültetett és nevelkedett gilisztaűző varádics virágjának vízgőz desztillációjával (éteres segédfázissal) nyert illóolajában 2 antibakteriális hatású anyagot azonosítottunk. GC-MS vizsgálatok alapján az illóolaj nem tartalmaz mérgező tujont. GC-MS és HPTLC-DART-MS/MS mérések alapján az aktív anyagok a krizantenol és a krizantenil-acetát, melyek gátolták az *A. fischerit*, a *X. euvesicatoriát* és az *R. solanacearumot*, míg a *P. maculicolát* és a *B. subtilist* csak a krizantenol gátolta (Móricz et al. 2014 HPTLC2014, a kéziratot készítjük elő publikálásra).

A számbogáncs levélkivonatból OPLC-vel izolált antibakteriális hatású komponensek GC-MS és LC-MS/MS vizsgálata során a levélben egy $C_{20}H_{26}O_8$ ($m/z= 393.1547$) összegképletű lignán származékot, szeszkviterpén laktonokat, valamint egy trihidroximetoxiflavont (ami lehet kaempferol metil észter) azonosított (Móricz et al. 2013 Balaton Symp). Azonban általánosan elmondható, hogy OPLC-s túlfuttatás esetén a szilikagél vékonyrétegből folyamatosan szilanol vegyületek távoznak, azaz az álló fázis „vérzik” (Móricz et al. 2012 Med Chem). Ebből következik, hogy a még egykomponensűnek hitt frakciók sem tiszták, és további tisztítást igényelnek egy esetleges NMR-es azonosításra. A gyökér kivonata is több antibakteriális komponenst tartalmaz, melyek egy része kinyerhető vízgőz desztillációval, azonban GC-MS-sel csak egy oxaspiro származékot tudtunk azonosítani. A fő antibakteriális sárga színű olajos komponenst sikerült elég tisztán nagy mennyiségben előállítani preparatív

flash kromatográfiával, így NMR vizsgálatot is végezhattünk, mely kimutatta, hogy 2, szinte teljesen megegyező anyagot tartalmaz 10:6 arányban. Preparatív HPLC-vel elválasztva a 2 anyagot, az NMR vizsgálat 2, sok kettős kötést tartalmazó anyagot mutat, egyetlen oxigén különbséggel. Pontos struktúra felrajzolása pontos tömeg meghatározása után várható, ami folyamatban van. Ezen 2 vegyület minden tesztelt kórokozót gátolt. BioAréna rendszerben a gátló zónájukat sem növelni, sem csökkenteni nem tudtuk formaldehid-befogó illetve generáló anyagokkal, ami azt mutatja, hogy a formaldehid nem játszik szerepet az antibakteriális hatásukban.

A számbogáncs gyökeréből izolált 2 anyag 10:6 arányú keverékét *in vivo* bab-babrozsa rendszerben is vizsgáltam. A növényeket 1 µl/ml vizes oldattal (impregnálószerrel (Tween) és ultrahangos rázatással elég jól sikerült a diszpergálása) kezeltem (permeteztem) a fertőzés után, s ezáltal sikerült a fertőzést 35-40 %-osra visszaszorítanom, azaz a egységnyi levélfelületeken lévő spóratelepek száma 60-65 %-kal csökkent a kontroll csoporthoz képest.

Ezen anyagok vizsgálata nemrég biotechnológiai irányba is elindult. Természetben gyűjtött *O. acanthium* magot csíráztattunk és a kis növényeket megfertőztük *Agrobacterium rhizogenes* törzsszel, hogy *hairy root* (hajszálgökér) képződést indukáljunk. Jelenleg épp a hajszálgökér képződésére várunk, ami remélhetőleg termelni fogja az aktív anyagokat.