

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Metabolomikai esettanulmányok torma (*Armoracia rusticana*) és
nagylevelű hárs (*Tilia platyphyllos* Scop.) növényeken**

Szűcs Zsolt

Témavezető: Dr. Vasas Gábor



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2020

Metabolomikai esettanulmányok torma (*Armoracia rusticana*) és nagylevelű hárs (*Tilia platyphyllos* Scop.) növényeken

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Szűcs Zsolt okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája
(farmakológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Vasas Gábor az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád az MTA doktora
tagok: Dr. Alberti-Dér Ágnes, PhD
Dr. Bak István, PhD

A doktori szigorlat időpontja: online webes felületen keresztül (ZOOM)
2021 . január 19.

Az értekezés bírálói:

Dr. Horváth Györgyi, PhD
Dr. Hunyadi Attila, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád az MTA doktora
tagok: Dr. Horváth Györgyi, PhD
Dr. Hunyadi Attila, PhD
Dr. Alberti-Dér Ágnes, PhD
Dr. Bak István, PhD

Az értekezés védésének időpontja: online webes felületen keresztül (ZOOM)
2021. január 19

Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a
szucs.zsolt@science.unideb.hu mail címre a vitát megelőző nap (2021. január 18.)
20:00 óráig. A határidő lejáratát követően technikai okok miatt már nincs
lehetőség a védéshez kapcsolódni.

A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

Bevezetés

A gyógynövények az elmúlt időszakban fontos helyet foglaltak el a gyógyászat világában. A gyógynövényes termékek fogyasztása az utóbbi években felerősödött, így ezen növények tanulmányozása igen fontos.

Az új növényi gyógyszerek és táplálékkiegészítők miatt fontos a növények fitokémiai vizsgálata, ami tágabb értelemben nem csak a növény által termelt bioaktív hatóanyagot jelenti, hanem a növénnel kapcsolatba lépő mikroorganizmusok vizsgálatát is.

A fentebb leírt vizsgálatokat az úgynevezett metabolomikai módszertannal vizsgáltuk, aminek előnye, hogy a műszeres mérésből nagyságrendekkel több adatot tudunk kinyerni, mint egy klasszikus, standardokkal végzett mérés esetében.

A metabolomikai vizsgálatok lehetnek célzottak vagy nem célzottak. Előbbi esetében egy vegyületet vagy vegyületcsalád tagjait vizsgáljuk, míg utóbbi esetében a mátrixban levő lehető legtöbb metabolitot szeretnénk vizsgálni. A metabolomika a gyógynövények minőségbiztosításában is jelentős szerepet játszik.

A disszertáció célja két különböző növény metabolomjának vizsgálata a két eltérő megközelítés szerint.

Az egyik modellnövényünk az *Armoracia rusticana* (torma) volt. Ez a növény elsősorban étkezési növény, de számos gyógyászatilag is releváns bioaktivitással rendelkezik. Ezen hatások leginkább a benne található izotiocianátoknak köszönhető, amik prekursoraikból egy enzimatis folyamat végén keletkeznek. Ebben az esetben a növényben található egy vegyületcsalád vizsgálatát végeztük el arra nézve, hogy a nem-patogén, úgynevezett endofiton gombák és a vegyületek közötti interakciót célzott metabolomikai megközelítéssel vizsgáltuk.

A másik modellnövényünk a *Tilia platyphyllos* (nagylevelű hárs) volt, ami egy gyógyászati szempontból igen értékes nyersanyag. Gyógyászati jelentősége igen nagy,

tradicionális használata Európa-szerte elterjedt, de számos tudományos eredmény is alátámasztja a benne található bioaktív vegyületek hatásosságát. Ezen növény egy speciális, a virágzat részét képező szervének, a murvalevelének a metabolomját követtük nyomon több mint száz napig, mivel ezen szerv sokkal tovább van jelen, mint a botanikai virág, amivel együtt gyűjtik. Ezen vizsgálatunkoz a nem célzott metabolomikai megközelítést alkalmaztuk.

A vizsgálatainak a megfelelően kidolgozott műszeres analitikai metodikákkal végeztük.

A két vizsgált növényünk mind szerv, mint metabolom szintjén nagyban különbözik egymástól, így ezen vizsgálatok a metabolomikai megközelítésüket tekintve is igen eltérőek.

Célkitűzések

A munkánk során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

Armoratia rusticana:

- Az endofitonok és a talajgombák képesek-e a GLS típusú vegyületek bontására?
- Ha képesek bontani a vegyületcsaládot, akkor ez a bontás milyen mértékű?
- A vegyületcsaládnak több különböző tagja van. A gombák képesek lehetnek mindet bontani, vagy kémiai szerkezet szerint diszkriminálnak?
- A GLC-k bomlásakor felszabaduló izotiocianátok (ITC-ek) fungicid hatását a gombák hogyan tolerálják?
- A GLC-k gombák általi bontását hogyan tudjuk monitorozni, a felszabadult, illékony ITC-ek milyen technikával tudjuk detektálhatóvá tenni?
- További interakciók a gombák és a vegyületcsalád között.
- A fentebb tárgyalt kísérletek alapján különböznek-e a torma eredetű endofitonok a talajgombáktól?

Tilia platyphyllos:

- A virágzat jelentős részét adó murvalevél metabolitpatternjét befolyásolja-e a betakarítási idő?
- Abban az esetben, ha metabolitok mennyiségét befolyásolja a gyűjtés időpontja, akkor ezen metabolitok mennyisége időben hogyan változik?
- Az időbeli lefutás vizsgálata során lehet-e csoportokba sorolni a vegyületeket?
- Van-e olyan vegyületcsoport, ami nem a virágzás alatt, a szokásos betakarítási időszakon belül a legabundánsabb?
- A vegyületcsoportok között van-e olyan csoport, aminek a teljes gyűjtési időszak alatt nem változik érdemben a mennyisége?
- A vegyületek szintjének változásának milyen következményei lehetnek?

A kérdések megválaszolására a metabolomika módszertanát használtuk.

Alkalmazott módszerek

A műszeres mérések paraméterei

LC-ESI-MS/MS: Az endofiton és talaj gombák által végzett glükoszínolát-bomlást, valamint a *Tilia platyphyllos* murvaleveleinek metabolitvizsgálatát LC-ESI-MS-ben képesek voltunk kvalitatív és kvantitatív módon meghatározni. Az alkalmazott UHPLC rendszer (Dionex Ultimate 3000RS) egy Thermo Q Exactive Orbitrap tömegspektrométerhez (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) volt kapcsolva, elektropray ionizációs forrással (ESI). A nyers adatokat az XCMS Online platformmal dolgoztuk fel. A platform által kapott adatokkal R-ben dolgoztunk tovább.

SPME-GC-MS: A glükoszínolát-bomlástermékek (izotiocianátok és nitrilek) mérésére, amik illékonyak, egy SPME-GC-MS módszert használtunk. A táptalajból légtérbe kerülő anyagokat 5 mg aktív szénnel tudtuk adszorbeáltatni. A mérési paraméterek a következők voltak: szplit arány: 10:1; a bemeneti hőmérséklet 150 °C volt, majd hőmérsékleti gradienst alkalmaztunk a mérés során. HP-5MS 5% (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) fenil-metil-sziloxán oszlopot használtunk. A hordozógáz He; áramlási sebesség 1 ml/min volt.

Gomba oltóanyagok készítése

A kísérletek kivitelezéséhez megfelelő, adagolható gomba oltóanyagot kellett készítenünk. A megfelelő folyékony táptalajon felnevelve a törzseket, a micéliumot steril körülmények között közel homogén állagúvá diszpergáltuk, és az ily módon elkészített oltóanyagot 4°C-on tároltuk. A kísérletekhez szükséges mennyiségű oltóanyagot a gomba szárazanyagtartalma alapján standardizáltuk.

Tortatáptalajon való gombainkubáció

A gombákat HRE táptalajon inkubáltuk. 40 µg/ml száraz tömegnek megfelelő szuszpenziót használtunk Eppendorf csövekben. A kontroll beoltatlan táptalaj volt. A

minták liofilizáltak, majd 250 μ L 10% 1-propanolban vettük fel a további feldolgozáshoz.

A *Tilia platyphyllos* növényi anyagának gyűjtése, mintaelőkészítés

A murvaleveleket négy szomszédos *Tilia platyphyllos* Scop. fáról gyűjtöttük a Debreceni Egyetem campusáról, a szerv megjelenésétől az szeneszenciáig (112 nap). A mintákat 40° C-ot meg nem haladó hőmérsékleten légátáramoltatással szárítottuk, a gyűjtést követően, majd egy éjszakán át tartó liofilizáltak. A szárított mintákat homogenizáltuk, majd 25 mg anyagot 1 ml MeOH-lal vontuk ki 30 percig 75 ° C-on. A kivonás után a felülúszót -24 °C-on tároltuk.

A kromatogramok kiértékelése és a vegyületek azonosítása

A kromatogramok kiértékelése az XCMS online szoftverrel történt (<https://xcmsonline.scripps.edu/>) az alábbi paraméterek használatával: (I) vegyület detektálás: centWave módszer, min. és max. csúcs szélessége = 5 és 20, S/N küszöb = 10, mzdif = 0,01, in.tegrációs módszer = 1, csúcs előszűrés = 3, előszűrés intenzitás = 5000, zajszűrés = 1000; (II) Retenció idő korrekció: Obiwrap módszer, profStep = 1; (III) Igazítás: mzwid = 0,015, minfrac = 0,5, bw = 5, max = 100, minsamp = 1; (IV) Statisztikai teszt: ANOVA. Az összes alkotóelem hozzávetőleges azonosítását LC-ESI-MS/MS segítségével végeztük.

Az azonosítások MS/MS spektrumok alapján az adatbázisból származó fragmentációs mintázaton (<https://metlin.scripps.edu/>), az irodalomból származó referenciákon és a rendelkezésre álló standardok fragmentálódásával történő összehasonlításon alapult.

Új tudományos eredmények

Armoratia rusticana

Torma endofitonok és talaj gombák glükoszínolát-bontó aktivitása

Tormakivonaton neveltük a különböző gombatörzseket, majd LC-MS/MS mérés segítségével megnéztük, hogy mely minták mennyi szinigrint, illetve egyéb glükoszínolátot tartalmaznak. A kísérleteinkből látszik, hogy az endofitonok általában hatékonyabban bontották ezen vegyületeket, mint a talajgombák. A bomlás sebessége bizonyos mértékben a glükoszínolátok oldalláncától függött.

A tormakivonatból különféle glükoszínolátok lettek azonosítva. A kimutatott kisebb glükoszínolátok alifás (glükonapin, glükokoklearin), tiometil-alkil (glükoiiberin) és indolos (glükobrasszicin) csoportba tartoztak. Az LC-ESI-MS detektálási érzékenységeinek változékonyságát figyelembe véve, a detektált GSL-ek közül többnek a jel aránya 0,73–1,72 volt szinigrinhez viszonyítva. Következésképpen a kisebb GSL-ek nagyjából 0,7–40,6 nmol (mindegyik) mennyiségben voltak jelen ebben a kivonatban.

A kontrollokban a legtöbb glükoszínolát koncentrációja nem változott szignifikánsan a 16 napos inkubációs periódus alatt ($p > 0,05$). A hét endofiton gombából hat sikeresen lebontotta a legtöbb vagy az összes glükoszínolátot ($p > 0,05$). Az inkubáció végére a hét törzsből hat szignifikánsan csökkentette a fő glükoszínolát, a szinigrin mennyiségét ($p < 0,001$). Az E7 törzs (*O. cerealis*) viszont képtelen volt bármit bontani. A szinigrin bontási képességét ugyanazon gombák esetében szintén teszteltük. Ez arra utal, hogy a nagy mennyiségű GSL jelenléte önmagában nem elegendő a GLS-t bontó enzimek indukálásához, Ez indokolta a HRE-ben végzett munka fontosságát.

A szinigrin és a glükonaszturciin koncentráció-csökkenésének meredekségből kiszámítható a bomlási sebesség, ami 0,606–1,476 mM/nap és 0,018–0,057 mM/nap tartományban volt. A fajon belüli különbségek az E1-E3 (*F. oxysporum*) és az E5-E6 (*P. radicina*) törzseknél jól megfigyelhetők. Míg az E1 már a növekedési szakaszában gyorsan lebontotta a legtöbb glükoszínolátot (1,125 mM/nap szinigrin;

0,057 mM/nap glükonaszturciin), addig az E3 sokkal kisebb aktivitást mutatott, és akkor is csak azután, hogy a növekedése leállt (0,606 mM/nap szinigrin; 0,030 mM/nap glükonaszturciin). Ugyanazon törzsek sokkal kevésbé különböztek az indolos glükozinolatok bontása esetében. Az E5 és E6 törzsek közötti különbségek kevésbé voltak kifejezettek. A különbség sokkal szembetűnőbb volt a metiltio-alkil-glükozinolatok és az aromás glükozinolatok esetében. A kísérlet végére az E6 csak a tiometil-alkil-glükozinolatok koncentrációját csökkentette, de ez a csökkenés nem volt szignifikáns ($p > 0,05$), szemben az E5-tel ($p < 0,001$). Másrészt az E6 az E5-höz viszonyítva 1,72-szeres sebességgel bontotta a glükonaszturciint. Az E2 törzs sokkal hatékonyabb volt az alifás GSL-ek bomlásában, mint a lassan növekvő E4–6 törzsek. Nyilvánvalóan látszik az adatokból, hogy a különféle glükozinolat csoportok bontási sebessége más és más. Az indol GSL-ket tudták a legkevésbé bontani a gombák. A többi osztályt (alifás, metitiolalkil és aromás) többé-kevésbé hasonló hatékonysággal bontották le.

A glükozinolatokat kevésbé bontották a talajgombák, amiket izoláltunk. A mérés után azt kaptuk, hogy míg néhány talajgomba aktív volt, általánosságban a hatékonyságuk alacsonyabb volt, mint az endofitonoké. Négy az inkubációs periódus végére lebontotta az összes szinigrint (S1–2, S9–10); kettő csak részlegesen (S4, S6), míg négy nem volt képes metabolizálni a szinigrint (S3, S5, S7–8).

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy ez az enzimatis tevékenység meglehetősen elterjedt. A fentebb bemutatott potenciális glükozinolat-bontási képesség kiváló példa arra, hogy a mikrobiális közösség hogyan változtathatja meg a növényi metabolomot különféle módokon. Az eredmények rávilágítanak a fajon belüli variabilitás fontosságára a növény-mikrobiom kölcsönhatások tanulmányozásakor.

A bomlástermékek kimutatása

SPME-GC-MS használatával a szilárd torma táptalajon növekvő endofitonok fölött lévő gőztérből sikeresen mutattuk ki a szinigrinból keletkező alil-izotiocianátot, a glutation konjugátumot pedig LC-MS segítségével a táptalajból sikerült kimutatni.

Megkíséreltük az ITC-ket vagy nitrileket is kimutatni a gőztérből. Meglepő módon csak az E5 és az E6 esetében volt kimutatható az AITC a Petri-csésze légterében. Az ITC teljes mennyiségének körülbelül 1,25% -a szabadult fel és került a gőztérbe a 6. napon E6 esetében 24 óra alatt. A másik négy szinigrin-bontó faj (E1-E4) esetében csupán nyomokban tudtunk kimutatni AITC-t a gőztérből. Az allil-cianidot egyetlen mintában sem tudtunk detektálni. Az ITC-ket azonban csak szabad formában tudjuk detektálni a GC-MS technikával, mivel a konjugátumok nem illékonyak.

Célzottan kerestünk az LC-MS mérésekben lehetséges nem-illékony GSL-metabolitokat (CysGly-AITC, Cys-AITC, glutation-AITC). Egy vegyületet találtunk, ami tömege és fragmentációja alapján GSH (glutation)-AITC konjugátum lehet. Azon gombák táptalaja, amelyek gőztérében nem volt AITC, nagy mennyiségben mértünk ki GSH-AITC adduktot.

A nulla időponti kontrollhoz képest az E1 és az E2 táptalajaiban 8,77-szer és 6,07-szer több GSH-AITC adduktot tartalmaztak. Ennél sokkal nagyobb arányú a különbség az E4, E5 és az E6 esetében (29,14, 14,05 és 43,27-szeres növekedés, $p < 0,01$). A GSH-AITC addukt jelenléte azt sugallja, hogy az ITC-k legalább részben a GSL konjugátumokként vannak jelen a gombákban. Az AITC spontán módon konjugálódik a gombák tiol-készletével (főleg GSH-val), aminek egy részét a táptalajba eliminálja a gomba. Az ITC toxicitás növekszik, ha a gombák GSH-készlete elfogy, fokozva a fehérje -SH csoportok elleni támadást.

Összességében a tioglükózidáz aktivitás elmarad a már megfigyelt GSL-bontó képességtől. A termék ITC volt, szabad vagy konjugált formában. Ezeknek a mikrobiális enzimeknek valószínűleg széles spektrumuk van: szubsztrátként elfogadják a legtöbb glükozinolátot, de a különböző GSL-eket eltérő sebességgel képesek bontani.

További, endofiton gombákon végzett kísérletek

Kizárólag szinigrint, mint szénforrást tartalmazó CzD táptalajon nevelve a gombákat, kimutattuk, hogy, a szinigrint sok gombatörzs fel tudja használni, bár nagyobb a különbség a talaj és az endofiton gombák között.

A hét torma endofitonból csupán négy képes volt felhasználni a szinigrint kizárólagos szénforrásként. A leghatékonyabb gomba ugyanolyan hatékonyan használta fel a szinigrint mint a glükózt (E1). A talajgombák esetében csupán három volt képes felhasználni a szinigrint. Ez a típusú kísérlet specifikusabbnak tűnik, mint a GSL-ek bontása az endofitonok és a talajgombák elkülönítésére.

A kísérlet értékelésekor megállapítható, hogy az endofitonok nagyobb mértékben képesek voltak tápanyagként felhasználni a védekezésre szánt metabolitokat, mint a talajgombák.

A viszonylag alacsony mennyiségű ITC sikeresen képes gátolni a vizsgált gombánk növekedését folyékony tápközegben. Itt is különbséget mutatkozik a két csoport között: az endofitonok jobban tolerálták az ITC-ket. A gombák nagy része az AITC-t, jobban tolerálta, mint a PeITC-t: az IC50-értékek közötti átlagos különbség 2,30-szoros volt. Érdekes, hogy az endofiton gombák között szinte hiányoznak az AITC-re kifejezetten érzékeny fajok.

Tilia platyphyllos

Szezonális variabilitás a *T. platyphyllos* murvaleveleiben

A metabolom a legjelentősebb változást a virágzás előtt mutatja azon belül is a 0–14. nap között, amikor igen intenzív a növekedés. A fiatal szervben metabolomja nagyon különbözik a virágzás és a későbbi fejlődési szakaszok metabolomjától. A virágzás során viszonylag stabil, de később a termésnövekedés során változás láthatunk.

A statisztikai korrekciók után ($n=504$) 241 vegyületről derült ki, hogy szignifikánsan ($p < 9,92E-5$) változik időben (ez a vegyületek 47,82%-a). Ezek közül 202 (40,07%) magas szignifikancia szintet mutat ($p < 1,98E-6$).

A metabolitok diverzitása és klaszterezése

Munkánk során nem csak a metabolit-változást, de a metabolom diverzitását is figyelembe vettük, amire a Shannon-indexet használtuk. Ez alapján a kezdeti metabolom igen változatos, ami lecsökken a szervfejlődés előrehaladásával, mélypontját pedig közvetlenül a virágzás előtt éri el. A kezdeti diverzitást csak a termésfejlődés után éri el ismét.

Az adatokat 6 klaszterbe rendeztük, amelyekből 4 nagy csoportot tudtunk felállítani az alapján, hogy van-e változás a metabolit szintjében, és ha igen, akkor csökkenő vagy növekvő trendet követ-e.

A fejlődés során koncentráció-változást nem, vagy kis mértékben mutató metabolitok

Számos vegyület nem mutatott szignifikáns szezonális variabilitást ($p > 9.92E-5$). Ezek többsége a 2., 4. és 5a. klaszterbe tartozik.

A 2. klaszter primer metabolitokat tartalmaz, nem azonosítottunk másodlagos metabolitokat ebből a klaszterből. Ennek a csoportnak a szintjei átmeneti csökkenést mutatnak a murvalevél növekedés során, majd az öregedés fázisban ismét csökken a szintje.

Hasonló csoport a 4-5a. klaszterek. Ezen csoportok metabolitjainak koncentrációi nagyságrendileg ugyanabba a tartományba esnek a szerv teljes élettartama alatt, a változások nem voltak szignifikánsak ($p > 9.92E-5$). A 4-5a. klaszterek flavonoid glikozidokat tartalmaznak, mint például kempferol-diglikozidokat, kvercetein-glikozidokat és egy kumarin-származékot.

A fejlődés során koncentráció-növekedést mutató metabolitok

Az 1. klaszter egy kompakt vegyületcsoport. Ezen kompakt csoport vegyületei alacsony mennyiségben vannak jelen a fiatal szövetben, de koncentrációjuk jelentősen növekszik a murvalevél növekedése során, és változatlan marad a későbbiekben is, bár egyes metabolitok esetében a koncentráció változása a virágzás befejezése után is

folymatódik. A legtöbb metabolit esetében a változás statisztikailag szignifikáns ($p < 9,92E-5$). Ez a klaszter bioszintetikus út szempontjából változatos csoport, mivel tartalmaz kinasav-származékot, kumarint és egyéb fenilpropanoidot.

A fejlődés során koncentráció-csökkenést mutató metabolitok

Az 5b.-6a. klaszterek felelősek a metabolom hirtelen változásának jelentős részéért a murvalevél fejlődésének első 14 napjában, valamint az 5b. klaszterbe tartozó vegyületek határozzák meg a fiatal murvalevél vegyületeinek karakterisztikáját. A korai szakaszban nagyon magas a vegyületek koncentrációja, ami a későbbi, fejlődési szakaszokra lecsökken. Maximális koncentrációjuk a 0. napon volt, majd gyors, statisztikailag szignifikáns csökkenés történt 7-14 napon belül ($p < 9,92E-5$). Például a (-)-epicatechin koncentrációja körülbelül tizedére csökkent az első két hétben. A 14. naptól kezdve ezen vegyületek koncentrációi gyakorlatilag állandóak maradtak a murvalevél élete során. Ezen csoport tagjai között flavonoidok domináltak, kempferol-pentozid például. Ez a csoport tartalmaz számos katechint és származékát, valamint klorogénsavat.

A fejlődés során átmeneti koncentráció-növekedést mutató metabolitok

A 3. és 6b. klaszterek alkotják ezt a csoportot, amelyben a vegyületek kezdetben alacsony koncentrációban vannak jelen vagy hiányoznak. Ezután a vegyületek koncentrációja átmenetileg növekedett, majd a virágzás kezdetétől kezdve nem mutattak egyértelmű tendenciát. Ez a trend pont ellentétes az 1. klaszterben megfigyelttel, ahol alacsony mennyiség volt a virágzás előtt, ennél fogva erős negatív korreláció figyelhető meg a két csoport között.

A 6b. alcsoport maximumja a 7-21. nap között volt, míg a 3. klaszter esetében ez 21-32 napra esett. Ez a csoport a flavonoidok és a kinasav-származékok nagy diverzitását mutatta, elsősorban glikozidokként. Az összes diglikozid flavonoidot és szinte az összes deoxihexozidot cukrot tartalmazó vegyület a 6b. alcsoportba sorolódott, például luteolin-deoxihexozid-pentozid, kinasav-hexozid. A flavonoidban gazdag virág

kinyílása előtti murvalevélben történő felhalmozódás arra utalhat, hogy később ezen vegyületek a virágba transzportálódnak így itt csak a vegyületek gyártása és raktározása történik. Egyes vegyületek koncentrációja nagyjából ötödére csökken, amiknek a tisztítását mindenképpen meg kellene előznie egy mintavételi idő optimalizálás.

A lehetséges alkalmazások, következmények

Mivel a metabolom a különböző időpontokban jelentősen eltér, ezért feltételezhető, hogy ez kihat a drog bioaktivitására is, valamint más felszívódási és eloszlási kinetikára is számíthatunk. Például a kumarinokhoz kapcsolódó bioaktivitások valószínűleg jobbak lesznek a későbbi fenológiai szakaszokban, míg a kinasav-származékok a virágzás előtt vannak a legmagasabb koncentrációban jelen.

A flavonoidok valamilyen formában mindig jelen vannak a murvalevélben, Ahogy általában, a flavonoidok elsősorban glikozid formában vannak jelen, amely glikozidokat majd az emberi gyomor-bélrendszerben élő bélbaktériumok, vagy a humán vékonybélből származó β -glikozidáz enzimek bontanak, így azok aglikonként fognak felszívódni. Röviddel a virágzás előtt és röviddel utána a murvalevél metabolomja rendkívüli hasonlóságot mutat a virágzáskori állapottal, ami a fő betakarítási időszak.

A bemutatott adatok azt mutatják, hogy a murvaleveleknek magas bioaktivitásuk lehet a virágzási időn kívül is.

Összefoglalás

Munkánk sikerrel alkalmazta a metabolomikai megközelítést a kérdések megválaszolására.

Jelen tanulmány során az *Armoratia rusticana* és a *Tilia platyphyllos* vizsgálatát végeztük el célzott és célzatlan metabolomikai megközelítéssel, és mind a metabolit-endofiton gomba interakció vizsgálatára, mind a murvalevél kémiai mintázat-változásának megfigyelésére igaz, hogy a metabolomikai megközelítés igen hasznosnak bizonyult. Főbb eredményeinek az alábbiak.

Az *Armoratia rusticana* esetében a fő következtetésünk az volt, hogy az endofiton gombák aktív interakcióban állnak a glükozinolát-mirozináz-izotiocianát (GLC-MYR-ITC) rendszerben. Az adatok alapján valószínűsíthető, hogy az endofitonok kimutathatóan adaptálódtak a gazdanövény gombaellenes szekunder metabolitjaihoz. Ez az alkalmazkodási képesség bizonyos mértékben megkülönböztette az endofiton gombákat az ugyanazon talajban található talajgombáktól.

Nem elhanyagolható tény, hogy a tormát kolonizálni képes endofiton gombák kiszoríthatják az egyébként patogénként funkcionáló egyéb mikroorganizmusokat, ezáltal védhetik magát a növényt is. Ezen tény ismeretében maga a növény sokkal védettebb, egészségesebb. Ha feltételezzük, hogy más, a gyógyászatban használt növények esetében is hasonló mechanizmus játszódik le, akkor ezáltal egészségesebb lesz a növény, ami akár magasabb hatóanyaghozamot is jelenthet. Ennek tekintetében nem elhanyagolható a növények endofiton gombáinak szelekciója és vizsgálata.

Tilia platyphyllos esetében a jelen munkánkban megállapítottuk, hogy a murvalevél a bioaktív fenolos vegyületek gazdag forrása lehet úgy a virágzás előtt mint után, bár a metabolitmintázat jelentősen eltérhet a különböző fejlődési stádiumokban. Különösen a murvalevél korai fejlődési szakaszát jellemzi a polifenolos vegyületek rendkívüli sokfélesége, a katechinszármazékok és a flavonoid-glikozidok nagy mennyisége. Ezek miatt a murvalevél potenciálisan terápiás értékű lehet úgy a virágzás során, mint a fejlődés korai szakaszában vagy a terménynövekedés kései fenostádiumában is.

Mivel a vegyületek mintázata a különböző stádiumokban eltérő, így a biológiai hatások is függhetnek a fenológiai stádiumtól. Érezhető ezek alapján annak szükségességére, hogy optimalizáljuk ezen növényi drog betakarítási idejét, ha különböző bioaktív komponensekre akarunk fókuszálni. Még egy hét is nagyban befolyásolhatja a növény másodlagos metabolitjainak mintázatát.

A tanulmány konklúziója során láthattuk a metabolomikai megközelítés fontosságát, miszerint elfogadható, hogy akár egy növényi metabolit-endofiton gomba interakció, akár egy metabolom időbeni lefutása nem feltétlenül ítéhető meg egy-egy paraméter vizsgálata alapján.



Nyilvántartási szám: DEENK/233/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szűcs Zsolt

Neptun kód: BBU0B3

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10046386

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szűcs, Z.**, Cziáky, Z., Kiss-Szikszai, A., Sinka, L. T., Vasas, G., Gonda, S.: Comparative metabolomics of *Tilia platyphyllos* Scop. bracts during phenological development. *Phytochemistry*. 167, 1-11, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112084>
IF: 3.044
2. **Szűcs, Z.**, Plaszkó, T., Cziáky, Z., Kiss-Szikszai, A., Emri, T., Bertóti, R., Sinka, L. T., Vasas, G., Gonda, S.: Endophytic fungi from the roots of horseradish (*Armoracia rusticana*) and their interactions with the defensive metabolites of the glucosinolate - myrosinase - isothiocyanate system. *BMC Plant Biol.* 18 (1), 1-15, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-018-1295-4>
IF: 3.67





További közlemények

3. Gonda, S., **Szűcs, Z.**, Plaszkó, T., Cziáky, Z., Kiss-Szikszai, A., Vasas, G., Mikóné Hamvas, M.: A Simple Method for On-Gel Detection of Myrosinase Activity.
Molecules. 23 (9), 1-11, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23092204>
IF: 3.06
4. Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., **Szűcs, Z.**, Balla, B., Vasas, G.: Efficient biotransformation of non-steroid anti-inflammatory drugs by endophytic and epiphytic fungi from dried leaves of a medicinal plant, *Plantago lanceolata* L.
Int. Biodeterior. Biodegrad. 108, 115-121, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.018>
IF: 2.962
5. Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., **Szűcs, Z.**, Nguyen, M. N., Vasas, G.: Myrosinase Compatible Simultaneous Determination of Glucosinolates and Allyl Isothiocyanate by Capillary Electrophoresis Micellar Electrokinetic Chromatography (CE-MEKC).
Phytochem. Anal. 27 (3-4), 191-198, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/pca.2615>
IF: 2.292
6. Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., **Szűcs, Z.**, Máthé, C., Vasas, G.: Effects of N source concentration and NH₄⁺/NO₃⁻ ratio on phenylethanoid glycoside pattern in tissue cultures of *Plantago lanceolata* L.: A metabolomics driven full-factorial experiment with LC-ESI-MS3.
Phytochemistry. 106, 44-54, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.07.002>
IF: 2.547

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,575

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 6,714

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományos ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.07.28.

