Válasz

Prof. Noszál Béla
„Új lehetőségek hatóanyagok fizikai-kémiai jellemzésére a gyógyszerkutatásban" című
az MTA Doktora pályázatomra vonatkozó bírálatára

Szeretném kifejezni köszönetemet Noszál Béla professzor úrnak a pályázatom részletes és mélyreható bírálatáért. Az előszavában megfogalmazott, kutatási munkámra és annak helyére vonatkozó megjegyzései külön is megérintettek. A bírálatában megfogalmazott számos kérdés úgy gondolom hosszabb távon is fontosak számomra, hiszen ilyen, általános, független rálátást, illetve véleményt ritkán kap az ember a munkájára vonatkozóan és úgy gondolom ennek tanúságai jó eséllyel kihatnak az ember egy adott területhez való viszonyulásához is. Külön is szeretném megköszönni támogató szavait, melyet nem csak magamra, de a pályázati munkában résztvevő kollégaimra vonatkozóan is nagy elismerésnek tartok.

Az általános szerkesztési, formai észrevételeit, a bírálat végén található hibajegyzéket sajnálattal olvastam, de természetesen a kritikai észrevételeit ezekre vonatkozóan elfogadom és köszönöm. Professzor Úr konkrét kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

Válaszaim Prof. Noszál Béla megjegyzésire, kérdéseire.

1. A bőr PAMPA modellben a dodekánt szilikonolajra cserélte, mert utóbbi javítja a membrán vízfelvevő képességét. Míg a dodekán kémiailag egységes anyag, addig a szilikonolaj molekulárisan heterogén. Nem lenne-e még egzaktabb a vizsgálat és a rendszer, ha a szilikonolaj valamely komponensét használta volna?

Válasz:

A PAMPA modell kétségtelenül kritikus pontja a mesterséges membrán, a lipid(ek), vagy azt modellező komponens(ek) és annak közege. Így természetesen a bőr PAMPA esetében is a szilikon olaj minőségének, a molekulaméret/viszkozitási tulajdonságainak hatása lehet modellben vizsgált hatóanyagok permeabilitására, a modell prediktivitására. A modell kidolgozásánál alkalmazott Baysilone márkanévre hallgató szilikon olaj véleményem szerint kellően jó minőségű, fizikai paraméterei alapján (viszkozitás: 950 – 1050 mPas, törésmutató (n_{20}): 1,405 – 1,407) viszonylag homogén termék. Azt azonban el kell ismerni, hogy homogénebb szilikon olaj frakciók, melyeket orvostechnikai (pl. szemészeti műtéteknél), kozmetikai felhasználásban alkalmaznak, alkalmas lehetne/lehetett volna a permeabilitás – szilikon olaj viszkozitás összefüggésének vizsgálatára, esetleg a modell finom optimalizálására.

2. A 13. oldalon azt írja, hogy a különböző lipideket/membrán komponenseket szerves parafinokban oldják. Költői kérdés: vannak szervetlen paraffinok is?

Válasz:

Köszönöm a kiigazítást, a parafinok előtt a szerves jelzőnek természetesen nincs értelme.

3. A 18. oldalon a bukkális adagolással kapcsolatban olvashatjuk: „...a szájüreg mukózán keresztül a nagyobb méretű molekulák permeabilitása jellemzően kedvezőtlenebb", később pedig az elnyújtott szájüregi kontaktidőt biztosító polimerek alkalmazásának indoklásaként azt írja: „a feltételt kielégítő formulációs segédanyagok egyike, a szájüregi mukóza epitél membránján permeabálni képes ciklodextrinek".
Ezzel kapcsolatban több kérdés és észrevétel is fölmerül: Minek tulajdonítható, hogy a szájüreg mukózán a nagyobb molekulák permeabilitása kedvezőtlenebb? Továbbá, ha a permeabilitásnak kedvez a hosszabb szájüregi tartózkodás, abban miként segít a ciklodextrin, ami – mint írja – „az epitél membránon permeabálni képes"? Végül, ezt az utolsó mondatot, különös tekintettel a permeabálni főnévi igenévre, tudná-e magyar nyelvi szempontból rehabilitálni?

Válasz:

Elismerem, hogy ebben a bekezdésben többszörös ellentmondásba keveredtem saját magammal is amikor leírtam. A nagyobb molekulák kedvezőtlen permeabilitása, így általános megfogalmazásban pontosításra szorul. Általános szabályként lehet mondani, hogy a kismolekulás hatóanyagok esetében a molekulaméretttel nő a lipofilitás, illetve romlik az oldhatóság. Bár lipofilitás növekedése javíthatja bizonyos határokon belül a permeabilitást, a fokozatosan romló oldhatósági viszonyok lassanként csökkentik a donor oldalon csökkenő hatóanyag koncentráció miatt a permeabilitás hajtóerejét. A másik aspektusa ennek a megközelítésnek, hogy a természetes lipidmembránokhoz hasonlóan, bár nem akkora mértékben, a foszfolipidek rendezettségéből, struktúrájából is adódik, hogy egy határon túl a növekvő molekulaméret gátja lehet a membránon való átjutásnak. Visszatérve a ciklodextrin permeabilitás befolyásoló, fokozó hatására, bizonyos értelemben mai napig sem tisztázott a pontos szerepe. A pályázatban megfogalmazott mondat viszont semmiképpen sincs ok-okozati összefüggésben a kérdés tárgyával. Pontosításként az elmúlt években történt saját és mások által közölt vizsgálatok alapján elmondható, hogy sok esetben épp permeabilitás csökkenés figyelhető meg a donor oldalon alkalmazott ciklodextrin alkalmazása esetén, különösen akkor, ha a vizsgált hatóanyag és az alkalmazott ciklodextrin közötti komplexstabilitás nagymértékű. Ugyanakkor, ha a hatást a fluxus változásán keresztül vizsgáljuk azonosíthatóvá válik, hogy a donor oldalon kialakuló nagyobb hatóanyagkoncentráció összességében nagyobb akceptor oldali hatóanyagmennyiség megjelenéséhez vezet. Így az egyes belépési kapukra vonatkoztatva összességében nagyobb biohasznosulást lehet elérni a ciklodextrinek alkalmazásával, akár az in vitro rendszereket tekintjük, de ezt több eseteben in vivo farmakokinetikai vizsgálatok is igazolták.

Egyetértek a permeabálni kifejezésre vonatkozó rehabilitációs igénnyel. Sajnos egzakt és a magyar nyelvnek sem idegen kifejezést nem biztos, hogy tudnék javasolni. Talán az epitél sejtek membránján penetrálni képes kifejezést nyelvtanilag helyesebb lett volna használnom.

4. A bukkális PAMPA modell korrelációja ex vivo sertés száj nyálkahártyán mért adatokkal című fejezetben leírja, hogy a sertés száj nyálkahártya adataihoz hasonlítandó, három modellt fejlesztettek ki. Ezzel kapcsolatban több kérdés is adódik:

   Legjobbnak bizonyult az önmagában dodekánnal kialakított modell. Bőr PAMPA esetében a dodekánt szilikonolajjal helyettesítette a jobb nedvesedés végett. Miért nem

alkalmazott ilyet a bukkális esetben, hiszen a szájüregben a nyál még komolyabb, állandó, természetes nedvesítő ágensként is működik.

A sertés ex vivo nyálkahártyával az ún. szájnyálkahártya-specifikus lipidkeverékkel kialakított PAMPA modell mutatta a legszerényebb korrelációt. A rangszámkülönbség-sorrend szerinti analízisben pedig az egyoldószeres, dodekán alapú és a gasztrointesztinális lipid-koleszterin keverék után következik a szájnyálkahártya-specifikus modell. Nevezhető-e ez ezek után szájnyálkahártya-specifikus modellnek?

Válasz:

Professzor Úr kérdését teljes joggal kollégáimnak és nekem is több esetben feltették a modell bemutatásakor. A szilikon olaj modellkomponensként történő alkalmazása nem merült fel. A modellfejlesztésnél a dodekán önmagában történő, mesterséges gátként történő alkalmazására azért esett a választás, hogy bizonyíthassuk a modell lipidspecifikus jellegét. Ebben az esetben azt lehet mondani, hogy a véletlen hozta, hogy az ex vivo sertés száj nyálkahártya modell permeabilitási adataival az ebben a PAMPA modellben kapott adatok korreláltak legjobban. Ebben az értelemben lehet azt mondani, hogy egy sertés száj nyálkahártya-specifikus permeabilitási modellt dolgoztunk ki. Természetesen értem bírálóm azon aggályát, hogyan lehet egy önmagában szerves oldószert tartalmazó folyadékréteget természetes lipid-specifikus modellként aposztrofálni. Biofizikai értelemben nyilvánvalóan sehogy, az elnevezés csak a modell felhasználására utal. Ugyanakkor az eredmény rámutat arra, hogy a farmakokinetikai értelembe vett belépési kapuk és a hatóanyagok közötti kölcsönhatások, azok hozzájárulásai meglehetősen eltérőek lehetnek, még abban az esetben is, ha csupán a passzív transzportfolyamatot vizsgáljuk. Például a vér-agy gát modell esetében sokkal hangsúlyosabb a lipidek poláris fejcsoportjainak nettó töltésének hatása, itt a dodekán mennyiségét csökkentenünk is kellett a biomimetikus hatás fokozásához. A bukkális modell esetében úgy tűnik, hogy a vegyületek klasszikus értelemben vett lipofilitása, a hármas egyensúlyban (donor oldat – dodekán – fogadó oldat) történő megoszlása nagyobb mértékben járul hozzá a vegyületek permeabilitásához, mint a lipidkomponensekkel kialakuló specifikus kölcsönhatások. Ezt, mint a példaként is említettem a vér-agy gát, de a szaruhártya permeabilitási modelleink esetében is megfigyeltük. Előbbit oldószer-, míg utóbbit lipidmembrán-vezérlet permeabilitási modellnek neveztem el. Arra a kérdésre, hogy miért a szövetspecifikus rendszerrel értük el a leggyengébb korrelációt azt tudom mondani, hogy sajnos standardizált száj nyálkahártyából izolált lipidfrakció nem érhető el kereskedelmi forgalomban. Így a specifikus lipidösszetételnek megfelelő összetételű keveréket nekünk kellett összemérni, ami tekintettel a lipidek konzisztenciájára nehezen reprodukálható, így meglehetősen rontja a modell reprodukálhatóságát.

5. A 26. oldalon olvashatjuk: „A tápcsatorna endotéljének közel semleges töltésű lipidmembránjához képest..." Egy membrán, és általában bármi vagy semleges, vagy „töltésű"

Válasz:

Az észrevétellel egyetértek, a töltés szónak itt nincs értelme.

6. A Di és mtsai által kifejlesztett PAMPA-BBB modellben mi indokolja, hogy a fogadó (lipid) oldat pH-ja is 7.4 legyen, tekintettel arra, hogy a központi idegrendszer, mint alapvetően lipoid közeg relatív permittivitása messze alacsonyabb, mint a vizes oldatoké, így a pufferek működése, pH-tartománya jelentősen megváltozik, kiváltképp az anionosból semlegessé protonálódó csoporttal rendelkező molekulák esetében.

Válasz:

Mechanisztikus értelemben bírálóm felvetése jogos. Mindazonáltal a PAMPA rendszer technikailag és reprodukálhatóság szempontjából is igényli a fogadó oldalon a pufferelt vizes közeg jelenlétét. A pH 7,4-es közeg ebben az esetben az intesticiális tér és a citoszol közegeket modellezi. Válaszomat még azzal egészíteném ki, hogy az egyik elfogadott, in vivo preklinikai agyi penetrációs vizsgálati rendszerben, a mikrodialízis vizsgálatban is jellemzően pH 7,4-es pufferált vizes közeget keringgetnek a rendszerben kvázi fogadó oldatként.

7. A 28. oldalon az áll: „a referencia hatóanyagok kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy agyi felszívódásukat aktív transzporterek ne befolyásolják." Hogyan lehet erről meggyőződni? Van-e erre erre nézve objektív biztosíték (azon túl, hogy valamely irodalom ezt állítja)?

Válasz:

Hasonlóan a 4. kérdéshez, ez is egyike a PAMPA modell kidolgozásához kapcsolódó „érzékeny" kérdéseknek. Leegyszerűsítve a rövid válasz az lehetne, hogy erről nem lehet biztosan meggyőződni. A kutatócsoport működési keretei nem tették lehetővé, hogy saját, sejtes alapú permeabilitási vizsgálatokkal igazoljuk minden, a vizsgálatba bevont vegyület esetén a transzporterek szerepét. Így természetesen a szakirodalomi adatokat kellett segítségül hívnunk, azzal a feltétellel, hogy igyekeztünk egy-egy vegyület esetében minél mélyrehatóbb irodalomkutatást végezni. Az kétségtelen, hogy sokszor az egyes források is ellentmondanak egymásnak. Ugyanakkor nehéz is lenne egyértelműen kijelenteni egy vegyületről, hogy részt vesz-e valamilyen transzporter fehérje a felszívódásában, vagy jelen esetben agyi penetrációjában, vagy sem. Sok esetben inkább arról lehet beszélni, hogy az adott vegyületnek inkább passzív transzport-vezérelt, másik vegyületnek meg inkább transzporter fehérje által vezérelt az adott belépési kapunk keresztüli transzportja. Ráadásul épp az egyik legfontosabb efflux transzporter, a P-gp ismerten a dózis növelésével könnyen telíthető (igaz ez inkább a gasztrointersztinális traktusban érhető el) és onnantól már inkább a passzív transzport veszi át az elsődleges szerepet a felszívódásban.

8. A 4. táblázat mutatja a membrán összetétel hatását a PAMPA – BBB modell előrejelző képességére, ahol az előrejelző képességet az R^2 értékek számszerűsítik és a színek is jelölik. Természetesen, a cél a minél jobb előrejelző képességet biztosító összetétel megtalálása, de a rossz előrejelző képességhez tartozó összetételnek is lehet tanulsága. A táblázat egyes rubrikáiban lévő értékek – érthető módon – viszonylag kevéssé térnek el közvetlen szomszédjaikétól, viszont – szintén érthető módon - jelentősebben eltérnek a kevésbé hasonló összetételű távolabbi szomszédjaikétól. Leginkább kilóg e tendenciából a 0,058 R^2 értékű, legvörösebb adat, mely így kiugróan rossz előrejelző képességet mutat. Van-e erre a jelenségre magyarázat?

Válasz:

Erre a kérdésre nehéz minden tekintetben teljes választ adni. A vér-agy gát modellezése esetén, különös tekintettel arra, hogy a Richter originális kutatásának is kritikus pontja volt, alaposan vizsgáltuk a membrán összetételének hatását az in vivo logBB értékek előrejelzésre vonatkozóan. Az tisztán látszik, hogy az agyspecifikus lipid jelenlétének, növekvő koncentrációjának pozitív, míg az oldószerként használt dodekánnak bizonyos határig negatív hatása van a modell jóságára vonatkozóan. Az eredmény közvetve sugallja, hogy van egy kritikus lipidkoncentráció, illetve oldószer összetétel, ami nyilvánvalóan a lipidrendszer egyfajta specifikus rendezettségére utal. Az elmúlt években többször is tettünk rá próbát, hogy ezt a rendszert magán a PAMPA szűrőmembránján, illetve izolált azonos minőségű szűrőmembránon vizsgáljuk. Vizsgálataink kiterjedtek az infravörös mikroszkópia, kisszögű röntgenszórás (SAXS) és pásztázó elektronmikroszkópia (SEM) vizsgálati módszerekre, de sajnos még nem jártunk eddig sikerrel, és igazi áttörést jelentő eredményről ezen a téren más kutatócsoportok leírásában sem találtam.

9. A foszfolipidózis Tomizawa modelljében az egyes hatóanyagok pH=4-en érvényes nettó töltése szerepel, azzal a nyilvánvaló feltételezéssel, hogy a töltés pozitív, hiszen a kationos vegyületek okozzák a foszfolipidózist. Bár ez nem a jelölt munkája, érdemes lenne figyelembe venni azt a körülményt – legalább egy megjegyzés erejéig – hogy pH=4-en szép számmal vannak anionos hatóanyagok is, az acetil-szalicilsavtól a G- és V-penicillinen át a flufenámsavig.

Válasz:

Az észrevétellel egyetértek, de valóban nem érzem az általam vizsgált modell szempontjából feladatomnak ezt figyelembe venni.

10. A 46. oldalon azt írja: „A legjobb korrelációt a közvetlen .... citoszól – liposzóma irányú transzportot jellemző ... PAMPA modellben kapott eredmények mutatták." Itt valószínűleg nem liposzóma, hanem lizoszóma a helyes fogalom.

Válasz:

Köszönöm az észrevételt, itt valóban elírásról van szó. Természetesen citoszól – lizoszóma irányú transzportot kívántam itt írni.

11. A foszfolipidózis PAMPA modell kidolgozásánál vizsgált egyik rendszerre használt „gradiens" kifejezés helyett a valóságot jobban megközelítő elnevezést kellene találni, még akkor is, ha ez az irodalomban elterjedtté vált. A gradiens ugyanis a helynek (vagy más független változónak) a függvényében történő folytonos, törés nélkül változó mennyiségnek (pl. koncentrációnak) a jelölésére vonatkozik (pl. gradiens elúció, vagy diffúziós koncentráció-gradiens), itt azonban mindössze 2 diszkrét pH értékű, térben elkülönülő közegről van szó.

Válasz:

Egyetértek Professzor Úr megjegyzésével, valóban a szakirodalomból vettem/vettük át a gradiens kifejezést, maga Alex Avdeef, a terület egyik kiemelt szakembere is ezt a kifejezést használja azokra a PAMPA modellelrendezéskere, ahol a donor és fogadó oldat pH értéke

eltérő, talán Ő is vezette be ezt az elnevezést. Elgondolkozva fenti megjegyzésen, valójában sem az izo- sem a gradiens-rendszer nem állja meg a helyét. Különösen annak fényében, hogy az általánosan alkalmazott PAMPA rendszerekben a hidroxónium- és hidroxid-ionok transzportja gátolt, így az eltérő pH-jú donor/fogadó oldali rendszerek esetében pH kiegyenlítődésről sem lehet beszélni. Talán helyesebb lenne a mono- és duális pH-jú rendszerek elnevezés.

12. A foszfolipidózist prediktáló PAMPA modellben vizsgált, és álpozitívnak ill. álnegatívnak nevezett esetekben valóságos (tehát nem ál) foszfolipidózis esély-növekedés ill. csökkenés következik be. Ezt ugyan nem (vagy nem egyedül) az eredetileg vizsgált vegyület okozza, hanem a metabolitja, de attól még a foszfolipidózis esélyének megváltozása tényleges. Ezért helyesebb lenne ezeket az eseteket másként, pl. metabolikus PLD+ - nak ill. metabolikus PLD- -nak nevezni, annál is inkább, mert ez a metabolikus átalakulás az adott vegyületeknél in vivo körülmények között is bekövetkezik, és egy ilyen elnevezés a változás okát is megjelöli.

Válasz:

Elfogadom a bírálatban leírtakat, a metabolikus PLD+/- kifejezés valóban jobban tükrözi a folyamatot és annak eredményét.

13. A 8. táblázatban lévő szövetspecifikus lipidkivonatok összetételének egyik jellemzője, hogy a membránalkotók 11 csoportba vannak osztva, melyek közül 9 kémiailag egységes anyag, 1 hasonló anyagok keveréke (neutrális lipidek), 1 pedig az „Egyéb" kategóriába tartozik, vagyis ismeretlen anyag vagy anyagok keveréke, ami különösen nagy %-ban fordul elő a vese és a BBB esetében. Talán ezzel is összefügg, hogy az első vizsgálatok a tüdő modellen történtek, ahol az „Egyéb" hányada a legkisebb. A lipidkivonat összetételének viszonylag rossz definiáltsága mennyiben befolyásolja a kidolgozandó szervspecifikus modell megbízhatóságát?

Válasz:

Úgy gondolom, hogy az általunk és mások által kidolgozott szövetspecifikus modellek lipidösszetételének bizonyított hatása a modell megbízhatóságra egyértelműen mutatja ezt a fajta összefüggést. Ugyanakkor azokban az esetekben, ahol kereskedelmileg hozzáférhető a természetes forrásból izolált szövet-, illetve szervspecifikus (agy, máj és szív) lipidkivonat, ott ez nem merül fel problémaként, hiszen a kivonat a nem azonosított komponenseket is tartalmazza. Sajnos a többi esetben a modellmembrán kialakításánál csupán az irodalmi adatokra lehet hagyatkozni, vagy megpróbálni standardizált módon izolálni a vizsgálni kívánt szervből, szövetből a szükséges lipidfrakciót. Én az előbbi utat választottam a kutatásaimban.

14. A 19. ábra felirata lineáris korrelációt említ, amiben nem kételkedünk, de erre vonatkozó korrelációs együttható érték, vagy ezt mutató egyenes az ábrán nincs.

Válasz:

A feliratozás sajnos ebben az esetben helytelen, hiszen ezen az ábrán csak azt kívántam bemutatni, hogy az egyes fitokémiai családokhoz tartozó vegyületek PAMPA-BBB permeabilitás értékei milyen tartományba esnek. Ennek tükrében, illetve a 18. ábra alapján, ahol már valóban a lineáris korrelációt mutatom be a vizsgált növényi eredetű vegyületek log*Pe* és in vivo logBB értékei között, jelöltük meg határértékként a log*Pe* = -6,0 értéket. Az ábrán látható módon a $\log Pe > -6{,}0$ tartományt zöld színnel, azaz BBB+, míg a $\log Pe < -6{,}0$ tartományt piros színnel, azaz BBB- jellel jelöltük.

15. Az 59. oldalon „esetenként bázikus szerkezeti egységet tartalmazó alkaloidot" említ. Az alkaloidok – mint nevük is mutatja – definíciószerűen tartalmaznak bázikus szerkezeti egysége(ke)t.

Válasz:

Köszönöm a kiigazítást, elfogadom a kritikai észrevételt.

16. Az 59. oldalon megállapítja, hogy a PAMPA–BBB jól használható növényi kivonatok esetében is. Ez így van és örvendetes, de meglepetést nem okoz, hiszen működése nem aszerint szelektív, hogy a vizsgált vegyületek szintetikus, növényi esetleg állati eredetűek, hanem nyilvánvalóan aszerint, hogy milyen molekuláris ill. fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, csakúgy, mint a valódi vér-agy gát esetében.

Válasz:

Professzor Úr észrevételét ebben az esetben is elfogadom azzal a megjegyzéssel, hogy magának a modell jellemzésének, validitásának igazolása szempontjából mégis csak van jelentősége a természetes eredetű vegyületekre történő kiterjesztésnek. Hiszen azok szerkezeti sajátságukban (így átlagosan, az egy vegyületben jelenlévő kiralitás centrumok és oxigén atomok száma nagyobb, míg a *N* atomok és aromás gyűrűk száma kisebb) eltérnek a klasszikus értelemben vett szintetikus gyógyszervegyületektől.

17. Hogy érti azt – amit a 69. oldalon ír - hogy „a természetes eredetű vegyületek (pl. a növényi szteroidok) gyógyszerkémiai szempontból ortogonálisak".

Válasz:

Az itt megfogalmazott ortogonalitás alatt a 16. kérdésre adott válaszban leírt szerkezeti sajátságokban megnyilvánuló eltéréseket értettem.

18. Az „apolar crude extra" kifejezésre használt ACE rövidítés helyett célszerű lenne mást keresni, mert az ACE rövidítést a farmakológiai és gyógyszerkémiai szakirodalom kiterjedten használja az angiotenzin konvertáz enzim gátló (ACE gátló) gyógyszerek esetében, de ugyanez a hárombetűs akronima több más területen is meghonosodott, pl. régi fájlok archiválásában és bizonyos hardverekre is.

Válasz:

A kritikai észrevételt elfogadom, bár a rövidítések véleményem szerint bizonyos határokon belül önkényesen használhatók abban az esetben, ha azokat megfelelő módon és helyen feloldjuk.

19. A zsálya kivonatokon végzett peroxinitrit – semlegesítési vizsgálatok summázatában írja, hogy a kidolgozott HPLC-DAD-peroxinitrit módszer lehetőséget biztosít a növényi kivonatokban lévő komponensek semlegesítő képességének kvantitatív jellemzésére is. A peroxinitrit kezelés előtti és utáni kromatogramokon látjuk, hogy mely zsálya-komponensek koncentrációja csökken vagy akár nullázódik. Ez több kérdést is fölvet: Próbáltak-e a kromatogramok alapján kvantitatív megállapításokat tenni, pl. egyensúlyi állandók számítására, ill. hogy az egyes növényi mintákban várható antioxidáns mennyiséghez képest milyen sztöchiometriai arányban adták a peroxinitritet.

Válasz:

Professzor Úr kérdése a vizsgálataink, illetve a módszerünk olyan mélyebb információjára vonatkozik, amit a pályázat kereteire való tekintettel hagytam ki a kéziratból. Természetesen végeztünk ilyen vizsgálatokat, melyek a pályázatban leírtakból valóban nem derül ki. Az SP12 jelű közlemény 3. táblázatában (alább) látható, hogy a zsályakivonat egyes komponensei esetén megadtuk a degradációs kinetika lineáris regresszióira vonatkozó paramétereket, melyeket egy olyan mesterséges zsálya kivonaton mértünk ki, melyben minden egyes komponens 100 μM-ban volt jelen. A vizsgálatban a peroxinitrit koncentrációját a táblázat címében is láthatóan 10 mM-ig emeltük, mely során a komponensek koncentrációjának a változását öt pontban vizsgáltuk. Az egyes komponensek peroxinitrit semlegesítő aktivitását az indikátor vegyület, peroxinitrit 50%-os védelmére (500 μM peroxinitrit jelenlétében) vonatkoztatva is megadtuk.

Table 3. Components of the model marker mixture in polarity order and their degradation kinetics parameters after reaction with increasing concentrations of $ONOO^-$ (0, 0.5, 1.5, 2.5, 5, 10 mM) and their individual scavenging activities ($n = 3$)

No.	Compound name	Degradation kinetic in mixture linear regression parameters				Individual scavenging activity		Activity categories
		$a \times 10^3$	b	n	R^2	IC_{50} (μM)	10^3 IC_{50}	
1	Gallic acid	16.539	–	5	0.9884	87.8 ± 17.7	11.390	■
2	Caftaric acid	5.904	–	6	0.9058	1,686 ± 211.0	0.593	◘
3	Caffeic acid	8.237	–	6	0.9811	237.6 ± 18.8	4.209	■
4	Scopoletin	0.346	5.58	5	0.901	NA	NA	□
5	Sinapic acid	5.315	17.76	5	0.9971	1,225 ± 195.4	0.816	◘
6	Rutin	2.278	–	6	0.9068	3,058 ± 250.4	0.327	◘
7	Pyrogallol red	9.859	–	6	0.9863	–	–	–
8	Luteolin 7-glucoside	1.754	2.66	6	0.8206	NA	NA	□
9	Apigenin 7-glucoside	0.337	–	4	0.8804	NA	NA	□
10	Rosmarinic acid	9.067	–	6	0.9715	134.4 ± 14.1	7.440	■
11	Salvianolic acid B	10.106	–	6	0.9974	73.3 ± 10.2	13.643	■
12	Quercetin	16.79	–	5	0.9381	49.3 ± 8.8	20.284	■
13	Salvianolic acid A	18.783	–	5	0.9524	24.8 ± 2.9	40.323	■
14	Apigenin	0.566	10.27	5	0.8771	NA	NA	□
15	Kaempferol	14.122	–	5	0.9878	95.5 ± 6.1	10.471	■
16	Chrysin	1.912	32.39	4	0.9053	NA	NA	□
17	5-Hydroxyflavone	3.822	51.14	4	0.8363	NA	NA	□
18	Carnosol	19.114	–	5	0.966	489.6 ± 110.8	2.042	◘

Activity categories: ■ active/great degradation, ◘ moderate activity/moderate degradation, □ inactive/no degradation
In the regression equation $Y = aX + b$, Y is $\Delta[S] = [S]_0 - [S]$ where S is the concentration of the single compounds and X is $[ONOO^-]$; n is the number of data points used for regression and R^2 is the squared correlation coefficient, IC_{50} is the concentration which protects 50% of pyrogallol red against 500 μM $ONOO^-$
NA = not active

A kérdés második felére vonatkozóan azt tudom elmondani, hogy az egyes kivonatokra szükséges a megfelelő peroxinitrit mennyiségét beállítani. Esetünkben a vizsgált

zsályakivonat 2 mg/ml koncentrációjú oldatában a peroxinitrit koncentrációjának meg kellett haladnia az 1 mM-t és 5 mM-nál alacsonyabbnak kellett lennie, annak érdekében, hogy az aktív és inaktív komponenseket hatékonyan megtudjuk különböztetni egymástól.

20. A 86. oldalon azt olvashatjuk, hogy „növényi kivonatok esetében az egyes antioxidáns hatással rendelkező komponensek befolyásolják egymás hatását." Van elképzelés arra, hogy a komponensek miként szinergizálják egymás hatását?

Válasz:

Rövid válaszként azt tudnám mondani, hogy a vizsgálat keretein belül a szinergista hatás mechanizmusára vonatkozóan a flavonoid és diarilheptanoid komponensek között nehéz lenne konkrétumokat megfogalmazni és még az egyes azonosított komponensek párosított antioxidáns hatásának vizsgálata sem történt ennek igazolására. Ugyanakkor általánosságban a növényi kivonatok egyes komponenseinek antioxidáns hatásban megnyilvánuló szigergizmusa részint az egyes komponensek eltérő hatásmechanizmusára vezethető vissza. Így pl. az egyes komponensek hatása megnyilvánulhat a szabad gyökök oxidációs reakcióinak gátlásában (megelőző oxidánsok); autoxidációs láncreakció terjedésének megszakításában (láncmegszakító antioxidánsok); a szabad lipidgyökök képződésének gátlásában; a fémek kelátképzésében és a fém prooxidánsok stabil termékekké alakításában. Ugyanakkor ezen hatások sem feltétlenül additív módon jelentkeznek az összetett kivonatokban, hiszen számos növényi komponens, például a flavonoidok jó része is nem csupán egy mechanizmuson keresztül fejtik ki az antioxidáns hatásukat. Ez egyúttal azt is jelenti, hogy a szinergizmus sok esetben a komponensek adott arányának függvényében jelenik meg, illetve tűnik el.

21. A 92. – 93. oldalon azt írja, hogy a pK_a meghatározások három legfontosabb módszere, a potenciometriás titrálás, a spektrofotometria vagy UV/pH titrálás és a kapilláris elektroforézis csak a makroállapotok és így a makro egyensúlyi állandók mérésére szolgál. Ez a megállapítás úgy módosítandó, hogy származékvegyületek beiktatásával, azaz deduktív módszerrel bármelyik fenti módszer alkalmassá tehető mikroállandók meghatározására is, ill. szimmetrikus vegyületek esetén azokra sincs szükség, továbbá ezen technikák kombinációja (pl. potenciometria plusz UV-pH titrálás) szintén alkalmas, sőt, gyakran alkalmazott módszer, végül pedig, ha pl. egy-egy funkciós csoport protonálódását szelektíven mutató sávot találunk az UV spektrumban, akkor ez a módszer önmagában is alkalmas lehet mikroállandók meghatározására.

Válasz:

A kiegészítést készséggel elfogadom és köszönöm.

22. A 112. oldalon az áll, hogy „...a felhasznált adatok igaz egy irányban, de eltértek a mi méréseinktől" Ezzel kapcsolatban megjegyzendő, hogy az egyirányban való eltérés általában súlyosabb, nem véletlenszerű, hanem szisztematikus hibára utal, aminek oka gyakran felderíthető.

Válasz:

Köszönöm az észrevételt. Valójában az egyirányú eltérés az arilfoszfonsav Jaffe és mtsai (1953, DOI: 10.1021/ja01105a054 és 1954, DOI: 10.1021/ja01635a022) és általunk mért

pK_a értékei között jelentkezett, melyet okát úgy gondolom felderítettünk, de ezek szerint a lényegi információ erre vonatkozóan sajnos rejtve maradt. A 108. oldalon utaltam rá, hogy a korábbi mérések direkt titrálással történtek és a fent említett közlemény alapján a titrálást vízben, illetve 50%-os etanol vizes oldatában 0,25 M-os NaOH oldat segítségével végezték, míg a mi vizsgálataink 0,15 M KCl oldatban különbségi titrálással történtek, standardizált módon, 25 °C-on. Jaffe és mtsainak közleményeiben a titrálás körülményeire vonatkozó hőmérsékleti adatot nem is adtak meg. Véleményem szerint az egyirányú eltérés az eltérő elektrolit ionerősségéből származhat.

23. Az arilfoszfonsavak két pKa értékkel rendelkeznek a foszfonsav két savi csoportja jóvoltából, amely csoportok a foszfonsav molekularész foszfor – szén kötésének szabad rotációja következtében egyenértékűek. Ilyen szimmetrikus esetben az első ill. a második savi disszociációs lépésre vonatkozó mikroállandók is számíthatók, amik már nem a molekula egészére, hanem annak konkrét csoportjára jellemzőek, a molekula egy definiált protonáltsági állapotában, így mélyrehatóbb képet adnak az adott molekulán belül uralkodó elektronsűrűségi viszonyokról, ezzel informatívak lehetnek a farmakokinetikai és farmakodinámiás viselkedés predikciójában is, nem utolsó sorban pedig, a mikroállandókkal végezhető Hammett összefüggések számításával beható ismeretek szerezhetők a molekulán belüli mezomer és egyéb elektronikus folyamatokról. Végeztek-e ilyen mikroállandó-számításokat? Itt jegyezném meg, hogy a karboxil-csoportot is tartalmazó arilfoszfonsavak NMR – pH titrálása alapján a háromcsoportos, a foszfonsav részen szimmetrikus molekulára vonatkozó mikroállandók is meghatározhatók, amelyek alapján esély van nemcsak a redukált, hanem a teljes molekulacsaládra vonatkozóan is a Hammett összefüggések megállapítására

Válasz:

Professzor Úr megjegyzése, illetve a felvetett mikroállandók meghatározásra vonatkozó igény teljességgel indokolt. Sajnos ilyen irányú vizsgálatokat nem végeztünk.

24. A 3.6.1. fejezet a 9-akridinkarbonsav származékok kapcsán jelentős mértékben foglalkozik a pK_a értékek mérés nélküli, in silico számítási módszereinek értékelésével, és a munka ezen kívül külön, részben 65% metanolos közegű vizsgálatokat szentel annak eldöntésére, hogy a pK_{a1}, ill. pK_{a2} érték döntően a karboxil vagy a protonált akridin nitrogén savi disszociációjához rendelhető, mert ez szabja meg, hogy savas közegben (pH 5 alatt) a töltésmentes vagy az ikerionos forma-e a domináns részecske. A disszertációban leírt döntés nyilvánvalóan helyes. A Marvin és az ACD Classic számításokkal kapott eredményekről azonban lerí, hogy elvi hibásak, mert a pK_{a1} értéknek szükségszerűen kisebbnek kell lenni, mint a pK_{a2}-nek, minimálisan 0,6 (2-szer log2) egységgel, ami komplexkémiai irodalomban a statisztikus esetnek nevezett alsó határérték.

Válasz:

Professzor Úr észrevételével egyetértek. A mért és különböző előrejelző programokkal becsült pK_a értékek összehasonlításának a tudományos érdeklődésen túl épp az volt a célja, hogy rámutassunk a szoftverek, adott esetben algoritmusoknak a hiányosságaira, azokat összevessük. Nem ez az egyetlen példa amikor hasonló anomáliát sikerült azonosítanunk.

Reményem szerint ezzel a szakma programfejlesztőinek is segítettünk a termékeik precízebbé tételében.

25. Mint a 119. oldalon írja „Az eredmény alapján így a pK_{a1} értékek savas, míg a pK_{a2} értékek bázikus csoporthoz kapcsolhatók. Mivel a nevezett pK_a értékek makroállandók, amelyek 2 vagy többcsoportos molekulák esetén definícószerűen nem rendelhetők funkciós csoporthoz, a fenti mondatot úgy kell módosítani, hogy dominánsan savi ill. bázikus csoporthoz tartoznak.

Válasz:

Az észrevételével egyetértek, köszönöm a kiigazítást.

26. A 119. oldalon azt írja, hogy az akridino-korona származékok és a 11 vegyület esetén, a 34-hez képesti pK_{a2} csökkenés alapvetően a makrociklus, ill. 11 esetén a két metoxi csoport sztérikus gátlásával magyarázható. Bár a makrociklusnak valóban van proton-repellens hatása, ami metoxi csoport esetén nyilvánvalóan kisebb, a bázicitás-csökkenésben bizonyosan komoly, sőt, valószínűleg elsődleges szerep jut az akridin 4- es és 5-ös szénatomjához kapcsolódó, elektronszívó oxigén atomoknak.

Válasz:

A kritikai megjegyzést elfogadom, a 4-es és 5-ös helyzetű szénatomhoz kapcsolódó oxigén atomok elektronszívó hatása valóban primer módon hathat az akridin molekularész bázicitására.

27. A diarilfoszfinsavakat tárgyaló fejezet első mondatában diarilfoszfonsavat ír, csakúgy, mint a 128. oldalon.

Válasz:

Köszönöm a megjegyzést, sajnálatos módon itt elírás történt, természetesen diarilfoszfinsavakra vonatkozott ez a mondat.

28. 125. oldalon szerves oldószerben (membránban) való „egyirányú megoszlás"-ról ír, amit talán értünk is, de a megoszlás ab ovo nem egyirányú.

Válasz:

Természetesen a megoszlás nem lehet egyirányú, így a megfogalmazásom pontatlan. A királis anionos koronaéter a vizsgálat primer aminok transzportját, a membránban való megoszlásának egyensúlyát tolta el az egyik irányba, a kísérlet beállított körülményei között.

29. A 128. oldalon az áll, hogy „az előzetesen számolt (Marvin) és mért pKa értékekben a legnagyobb eltérést 6 és 19 koronaéter származékok esetében kaptuk." A 19. táblázat azonban azt mutatja, hogy legnagyobb az eltérés (3,17 pK_a egység) 2 esetén fordul elő, vannak továbbá 2 fölötti eltérések is, de 19 esetén ez csupán 0,56.

Válasz:

Egyetértek Professzor Úr észrevételével, sajnos ebben az esetben a megfogalmazás nem elég egyértelmű, részben hibás. A megállapítás a kizárólag NO_2 csoport helyettesítőt tartalmazó koronaéter származékokra akart vonatkozni és egyúttal azt akart kifejezni, hogy a **19**, szubsztituálatlan származék pK_a értékével való összevetés alapján a legnagyobb eltérést a számított és egyúttal a **19**-es származékkal szemben a **6**-os vegyület esetében tapasztaltuk, illetve az **5**-ös, **6**-os származékok esetében tapasztaltuk az *orto* helyzetű NO_2 csoportok diarilfoszfinsav egységre vonatkozó saverősségcsökkentő hatását és ezek közül a számított pK_a érték a **6**-os származék esetében tért el nagyobb mértékben az általunk mért értéktől.

30. A 17. táblázatban látható, irodalmi módszerekkel számított pK_a adatok kritikai értékelésében a szerző azt mondja, hogy ezek korlátozottan használhatók. Ez igencsak diplomatikus fogalmazás. Amikor ugyanis azt látjuk, hogy pl. az (*R,R*)-2 alapvegyületre a mért, valós pK_{a2} érték 3,66, amire az egyik számítási program mínusz 0,26-os értéket, egy másik pedig +7,56-os értéket ad meg, vagyis az ugyanolyan ionizációs állapot eléréséhez a két számítás szerint 8 pH egységnyi eltérés adódna, amekkora pH különbség az emberi szervezetben elő sem fordul. akkor e módszerekről nyugodtan kimondhatjuk, hogy fabatkát sem érnek.

Válasz:

Egyértek Professzor Úr megjegyzésével és bár ez talán valóban túl diplomatikus megállapítás erre az esetre vonatkozóan, a korábbi cikkeinkben, ahol az egyes gyógyszeriparban is általánosan használt becslő programok benchmarking elemzését végeztük, hasonlóan másokhoz, a becslés hibájának elfogadási határaként 0,5, illetve 1,0 pK_a egységet vettünk. A 0,5 pK_a egység eltérést egyedi vegyületekre, az 1,0 pK_a egységet pedig egy-egy szerkezeti körre, vegyületkönyvtár alcsoportra vonatkoztatva kell érteni.

31. A hatóanyag - ciklodextrin – víz – oktanol rendszerben érvényes hatóanyag – ciklodextrin komplexképződési állandó meghatározásának milyen előnyei vannak a korábbi, ismert komplexképződési állandó – meghatározási módszerekhez képest?

Válasz:

Általánosságban nehéz lenne egyértelmű előnyökről beszélni, mert az egyes módszereknek szinte kivétel nélkül van olyan független információtartalma, amit a többi módszer nem vagy csak részben elégít ki. Áteresztőképesség és robusztusság szempontjából véleményem szerint egyértelmű az előnye a módszerünknek a különböző spektroszkópiai (UV-vis, fluoreszcens, NMR), illetve ezek kapcsolt titrálási módszereivel szemben. Ugyanakkor ezen módszerek egyértelműen előnye különböző szintű szerkezeti információ a hatóanyag – ciklodextrin komplexképződésre vonatkozóan. Az oldhatósági izoterma alapú mérési módszer nagy fokú variabilitása, ami alapvetően az eljárás pH, hőmérséklet és az oldat elektrolit ionerősség érzékenységéből fakad, jelenti az elsődleges hátrányt a módszerünkkel szemben, illetve áteresztőképessége is elmarad az általunk alkalmazott félig automatizálható titrálási módszerhez képest. Talán praktikusnak tűnhet a megközelítés, de úgy gondolom, hogy az a tény, hogy a vizsgálati módszer „járulékos információjaként" a gyógyszerkutatás számára olyan alapvető paramétereket is meg kell határoznunk, mint a vegyület pK_a és log*P* értéke, további előnyt jelenthet. Hiszen így egyúttal a szűrés –

optimalizálás – fejlesztés vizsgálati kaszkádba is jól illeszthető a módszerünk. Végezetül tekintettel arra, hogy a log*P* értéket a hatóanyagok várható farmakokinetikai viselkedésének közvetlen, illetve közvetett előrejelezésére is felhasználjuk, a log*P* változáson keresztül a hatóanyag – CD kompexképződés ezen folyamatokra (pl. felszívódás, toxicitás) gyakorolt hatására vonatkozó extra információt kaphatunk a kidolgozott módszer segítségével.

Bízom benne, hogy a kérdésekre és észrevételekre adott válaszaim megfelelően lefedik a bírálatban megfogalmazott problémák tárgykörét.
Végezetül, szeretném újból megköszönni Noszál Béla professzor úrnak a pályázatom pozitív értékelését, a bírálatra fordított idejét, kritikai észrevételeit és kérdéseit, melyek, ahogy válaszom elején is írtam, nagyon sokat segítetek abban, hogy munkám egyes aspektusait más szempontból is megvizsgáljam, adott esetben újraértékeljem.

Budapest, 2020. május 25.

Balogh György Tibor