

Válaszok Prof. Dr. Szőkő Éva egyetemi tanár opponensi véleményére

Hálásan köszönöm Dr. Szőkő Éva Professzor Asszonynak doktori értekezésem gondos értékelését, konstruktív kritikai megjegyzéseit, előremutató tanácsait.

Az értekezéssel kapcsolatos észrevételekre és kérdésekre az alábbiakban szeretnék válaszolni.

1. *„Az egyes vegyületcsoportokkal végzett mérésorozatok eredményeinek bemutatása koherens és megfelelő az összevetésük a konkrét irodalmi előzményekkel, adatokkal. Ugyanakkor némi hiányérzetet ad, hogy a szerző nem törekszik arra, hogy összekösse/összevesse a saját mérései alapján hasonlóan viselkedő vegyületeket, kiemeljen bizonyos közös vonásokat.”*

Egyetértek azon észrevétellel, miszerint a hasonló módon viselkedő tesztvegyületek farmakológiáját nagyobb szintetikus igénnyel is lehetett volna interpretálni. Egy-egy fejezet összeállításakor az abban vizsgált vegyületek közös szerkezeti elemére, ill. a vélhetően abból eredő farmakológiai sajátosságok kiemelésére koncentráltam. Az egyes csoportok összevetése valóban nem kapott kellő hangsúlyt.

2. *„Bár a citosztatikus és a citotoxikus hatás kifejezés alkalmazásában a szakirodalom sem igazán konzekvens, ezek szinonimaként való használata a dolgozatban helyenként zavaró...”*

A citosztatikus és citotoxikus kifejezések nem pontosan definiált használata valóban zavaró. A saját eredményekkel kapcsolatban ezért is törekedtem a következetes szóhasználatra, sejtosztódást gátló, ill. sejtkárosító értelemben említve a fenti kifejezéseket. Ez az írás közbeni szándék néhány esetben sajnos nem teljesült maradéktalanul.

3. *„Nem egyértelmű a különbségtétel az antiproliferatív és a citotoxikus (a sejtek életképessége) hatás között az inkubációs idők alapján. Az apoptotikus sejthalál jelei többnyire legalább 48 és nem 24 óra kezelés után figyelhetők meg.”*

Az antiproliferatív és citotoxikus hatás inkubációs idők alapján történő megközelítése irodalmi előzmények alapján történt (Pessina *et al.*, 2001). Az alkalmazott adherens sejtvonalak duplázódási ideje tekinthető 1 napnak, a közölt értékek a 16,5–26,4 órás tartományba esnek (Sutherland *et al.*, 1983, Kumei *et al.*, 1989, Nelson and Fry, 1997). Ezek alapján a 24 órás inkubáció alatt jelentős proliferáció nem történik, így az esetlegesen csökkenő viabilitás sokkal inkább a sejtek direkt károsodásának tudható be, mint az osztódás gátlásának. A jelentős számú osztódás hiánya miatt nagyobb sejtszámból célszerű kiindulni, ezért alkalmaztunk – részben irodalmi adatok, részben előkísérletek alapján – 25.000 sejtet üregenként. A 72 órás expozíció során többszöri sejtosztódás történik, ezért kisebb a kiindulási sejtszám. Ilyenkor a viabilitás csökkenését jellemzően antiproliferatív hatásként értelmezzük, jóllehet a direkt károsodás nem zárható ki. A két eredmény összevetése hasznos információt adhat a

direkt toxicitás és az osztódásgátlás viszonyáról.

Az apoptózis biokémiai markereit igyekeztünk a lehető legkorábban dokumentálni. A folyamat időbelisége természetesen erősen függ a kísérleti körülményektől, így pl. sejt kultúrában sokkal gyorsabb, mint élő környezetben (Sundquist *et al.*, 2006). Az általunk alkalmazott HeLa sejten *in vitro* körülmények között ideális esetben 24 órán belül kimutathatók az apoptotikus markerek, így a legtöbb ezirányú vizsgálatunkban 24 órás behatás után kívántuk igazolni a jelenséget (Sundquist *et al.*, 2006, Hashimoto *et al.*, 2012, Cheng *et al.*, 2017). Ez a vizsgált farmakonok egy részénél sikeres volt és meggyőző mértékű hipodiploid (szubG1) populáció emelkedést, vagy kaszpáz aktiválódást találtunk (pl. triazol-ösztánok (**2f**, **2g**), szteroid-oximok (**6a**, **6b**), szeszkviterpének (**14a–d**)). Más vegyületek esetében egyértelmű proapoptotikus effektust csak hosszabb expozíció után tudtunk igazolni (pl. D-homoösztan (**7a**), 17 β -HSD1 gátlók (**10e**, **10f**)). A vizsgálatokat minden esetben azonos ideig inkubált kontrollokhoz hasonlítottunk, így az apoptózis tényét a hosszú behatás ellenére igazoltnak látjuk.

4. *„A vegyületek antiproliferatív hatásának tumorszelektivitását a nem daganatos eredetű, de transzformált sejtvonalakon mért IC₅₀ értékek alapján állapítja meg a szerző. Primer sejt kultúrán (pl. fibroblaszt, HUVEC) végzett mérés erre alkalmasabb lett volna.”*

A tumorszelektivitás jellemzésére egy esetben, az izogravakridon-klorin (**12a**) esetében alkalmaztuk a nem malignus eredetű immortalizált epiteliális hTERT-HME1 sejtvonalat. A vegyületcsoportot többek között 4 emlőkarcinóma eredetű sejtvonalon vizsgáltuk, a közös szöveti eredet miatt láttuk indokoltnak az immortalizált sejtvonal alkalmazását. A többi kiválasztott vegyület esetében tüdő eredetű, humán főtájs fibroblaszt sejteket (MRC-5) alkalmaztunk a tumorszelektivitás leírására.

5. *„A vegyületek tumorszelektivitását a ciszplatinéhoz hasonlítja. Esetenként azonban csupán a nem-daganatos sejtvonalon kapott IC₅₀ értékeket hasonlítja össze (pl. 78., 81. oldal), ami önmagában nem alkalmas a szelektivitás jellemzésére.”*

A tumorszelektivitás értékelésére természetesen nem elégséges a fibroblaszton kapott eredmények összehasonlítása, azokat össze kell vetni az adott tesztvegyület tumorsejteken tapasztalt aktivitásaival. Az észrevételben megjelölt szakaszok a Diskusszió részei, ahol már csak a fibroblaszt sejteken kapott adatokat értékeltem, a tárgyalt vegyületek tumorelles hatásait megadó IC₅₀ értékek az értekezés Eredmények fejezeteiben szerepelnek, nevezetesen az 5. táblázatban, ill. a 7. és 11. ábrán. A tumorszelektivitás leírása precízebb lett volna, ha valamennyi releváns adatot szerepeltettek a Diskusszióban is.

6. *„Bár több vegyület esetében deklarálja a tumorszelektív antiproliferatív hatást, a daganatos és nem-daganatos sejteken kapott IC₅₀ értékek között sokszor legfeljebb kétfélszerez az eltérés ...”*

A tumorszelektivitás kritériumát nem definiáltam az értekezésben, így olyan tesztanyagokra is deklaráltam, amelyek IC₅₀ értékei szerény mértékben kedvezőbbek,

mint a referenciaként használt ciszplatin értékei. Egyes vizsgált vegyületek esetében (pl. **2f**, **2g**) ez a feltétel teljesül, ám a tumorsejtekre és fibroblasztokra gyakorolt antiproliferatív hatások különbsége nem meggyőző, így a tumorszelektivitás vitatható. Ugyanakkor jelentős számú bemutatott farmakon esetében ígéretes – rendszerint 10 μ M alatti – IC₅₀ értéket kaptunk valamelyik malignus sejtvonalon, míg a fibroblasztokra gyakorolt proliferáció gátlás a maximális 30 μ M mellett sem érte el az 50%-t. Az ilyen vegyületek (pl. **5c**, **6a-c**, **7a**, **10a-c**, **10e**, **10f**, **13a**, **13b**) esetében indokoltnak tartom a tumorszelektív, ill. az adott malignus sejtvonalra szelektív hatás megállapítását.

7. *„A rezisztencia revertáló hatás kifejezést kerülném. Nem egzakt és magyarul nagyon rosszul hangzik.”*

A „rezisztencia revertáló” kifejezés használatára van példa a magyar nyelvű szakirodalomban, jóllehet általánosan nem terjedt el. Valóban szerencsésebb lett volna a „rezisztencia módosító” kifejezés használata.

8. *„A szteroid analógok bemutatásánál a szerkezet-hatás vizsgálatok leírásának követését könnyítette volna, ha a szokásoknak megfelelően megadja a szénatomok számozását.”*

Egyetértek az opponensi észrevétellel, a szteroid váz szénatomjainak számozása biztosan segítette volna a szerkezet-hatás összefüggések megértését. Bízom abban, hogy ez a hiányosság nem nehezítette jelentősen az értekezés olvasását.

9. *„A **7a** vegyület esetében felmerült közvetlen gátló hatása a tubulin polimerizációra. A tubulin polimerizációra gyakorolt hatás in vitro vizsgálata során miért a polimerizáció sebességét fokozó paklitaxelt és miért nem az azt gátló vinca alkaloid(ok)at alkalmazták referenciaként? Miért nem vizsgálták ezen a teszten a referenciának tekintett 2ME-t?”*

A D-homoösztron (**7a**) tubulin polimerizációra gyakorolt direkt hatását a sejtciklus-eloszlásra gyakorolt hatás alapján láttuk indokoltnak. A G2/M populáció növekedésének, ill. a mitotikus sejtszám csökkenésének kézenfekvő magyarázata a tubulin diszruptor tulajdonság, ami lehet a tubulin polimerizáció bármely irányú változása. A feltételezett direkt hatás bizonyítására, ill. kizárására végeztük a kinetikus fotometriás vizsgálatot. A referenciavegyület használatának célja ebben az esetben is a mért paraméter – jelen esetben a tubulin polimerizáció sebesség – befolyásolhatóságának igazolása volt. Ehhez a kit gyártója javasolta a paklitaxelt, az a kit része volt. A 2-metoxiösztradiol tubulin polimerizációra gyakorolt hatását nem vizsgáltuk, a vegyület ezirányú hatását irodalmi adatok alapján elfogadtuk (D'Amato *et al.*, 1994).

10. *„A **7a** vegyület HeLa sejtekre szelektív antiproliferatív hatásának diszkussziójában felveti a p53 funkciójának helyreállítását/javítását. Végeztek vizsgálatokat ennek igazolására?”*

Szintén a **7a** vegyület lehetséges hatásmechanizmusával kapcsolatban a diszkusszióban felvetem a humán papillómavírus kóroki szerepét az alkalmazott sejtvonalakban,

elsősorban a HeLa sejtekben. A virális onkoprotein gátolja a p53 tumorszuppresszor működését, így felvetődik, hogy a HeLa-szelektív antiproliferatív hatás hátterében a p53 funkciójának restitúciója áll. Ezt a **7a** vegyületre nem bizonyítottuk, hasonló hatású tesztanyagok hatásmechanizmusának részletgazdagabb feltárására tervezzük a p53 fehérje szintű meghatározását.

11. *„A **8c** vegyület ribonukleotid reduktázt, így a DNS szintézist gátló hatásának magyarázatára elegendő antioxidáns aktivitásának igazolása? Megerősítette ezt esetleg másik antioxidáns vegyület ribonukleotid reduktáz gátló hatásának vizsgálatával/kimutatásával? Végeztek-e mérést a vegyület DNS szintézist egyéb mechanizmussal gátló lehetséges hatásának vizsgálatára, pl. a BrdU beépülésének mérésével?”*

A **8c** vegyület ribonukleotid reduktázt gátló hatásában természetesen az antioxidáns tulajdonság mellett más tulajdonságok is szerepet játszhatnak. Az enzimről ismert, hogy a nukleotidok redukcióját gyökdependens reakcióval katalizálja. A reakcióban meghatározó szerepet játszó tirozil szabad gyök szokatlanul stabil, felezési ideje mintegy 4 nap (Stubbe and Riggs-Gelasco, 1998). Az enzim gyökfogó tulajdonságú antioxidánsokkal bénítható, ami természetesen nem zárja ki a tirozil gyöktől független gátlás lehetőségét. Az enzim antioxidáns vegyület általi gátlását magának az antioxidáns hatásnak tulajdonítják (Fontecave *et al.*, 1998, Madlener *et al.*, 2007, Cai *et al.*, 2011). Az összefüggést jómagam egy lehetséges kézenfekvő magyarázatként vettem fel, amit erősít az egyes hatások kifejtéséhez szükséges koncentrációk közelsége (ribonukleotid reduktáz gátlása: 6,0 μ M, lipidperoxidáció gátlás IC_{50} : 2,0 μ M, gyökfogó hatás IC_{50} : 13,1 μ M). A **8c** vegyület esetében nem határoztuk meg a BrdU inkorporációját.

12. *„Az ABCB1 transzportert befolyásoló hatás vizsgálatánál többnyire nem talált összefüggést a teszt vegyületek transzportert gátló hatása (rodamin akkumuláció) és a transzportert expresszáló sejteken a doxorubicin antiproliferatív hatásának potencírozása között. Hiányolom a vegyületek és a doxorubicin együtthatásának vizsgálatát (vagy annak bemutatását) a transzportert nem expresszáló parentális sejteken, ami talán magyarázattal szolgálhatna.”*

Nem találtunk egyértelmű összefüggést a vizsgált vegyületek rodamín akkumulációra gyakorolt hatása és az ABCB1 szubsztrát citosztatikummal kimutatható interakció között. Ez érvényes mind a szolanidin analógokra (**8a–k**, **9a,b**, **9d–f**), mind pedig a tesztelt alkaloidokra (**11a–e**, **12a–h**). A rodamín akkumuláció az ABCB1 funkciójának gátoltságára utal, ami alapján várható a szinegrizmus a transzporter szubsztrátjával (pl. doxorubicinnal). A két módszerrel nyert eredmények közötti összefüggést más munkacsoportok sem mutatták ki, ami arra utal, hogy az a feltételezett formában nem működik (Ambroz *et al.*, 2017, Reis *et al.*, 2017). A rodamín akkumulációs vizsgálatban a tesztanyaggal csak percekig exponáljuk a sejteket, így egy akut és intenzív behatás eredményét mérjük, míg a kombinációs kísérlet során tartós – jelen esetben 72 óra – inkubáció történik. Mindezen eredmények és feltételezések fényében az akkumuláció meghatározását egy előszűrőként célszerű értelmezni, a hatásos vegyületek egy része fokozhatja az ABCB1 szubsztrátok hatását, de a hatás mértékére a pumpa gátlása nem

utal.

Elfogadom Opponensem véleményét, miszerint az interakció, ill. annak hiánya a parentális sejten pontosabban megvilágíthatna volna a szinergizmus módját, bizonyíthatna volna az ABCB1 szerepét. A prezentált eredmények csak az szinergizmus tényét bizonyítják: a **8h** vegyület saját antiproliferatív hatás nélkül fokozta a doxorubicin hatását.

13. *„Valóban elegendő lehet a transzporter expressziójának kb. 15%-os csökkenése (mRNS szinten) a doxorubicin hatás potencírozására a 12d és 12e vegyületek esetében?”*

Az akridonvázas alkaloidok (**12d** és **12e**) doxorubicinnal mutatott interakciójával kapcsolatban az érintett transzporter mRNS-szintű expressziójának 10-15%-os csökkenése biztosan nem magyarázza magát az interakciót. Az ABCB1 protein-szintű meghatározását nem végeztük el, így az expresszió változása csak egy lehetőségként merült fel.

Végezetül ismételten szeretném megköszönni Professzor Asszony részletes értékelését, előremutató kérdéseit és kritikai észrevételeit. Mindezek jelentősen hozzájárulnak jelenlegi és későbbi munkáim minőségéhez.

Tisztelettel kérem az opponensi bírálatra adott válaszaim elfogadását.

Szeged, 2018. május 22.

Dr. Zupkó István
egyetemi docens

Hivatkozások

- Ambroz M, Matouskova P, Skarka A, Zajdlova M, Zakova K, Skalova L: The effects of selected sesquiterpenes from *Myrica rubra* essential oil on the efficacy of doxorubicin in sensitive and resistant cancer cell lines. *Molecules* **22** (2017)
- Cai W, Zhang L, Song Y, Zhang B, Cui X, Hu G, Fang J: 3,4,4'-Trihydroxy-trans-stilbene, an analogue of resveratrol, is a potent antioxidant and cytotoxic agent. *Free Radic Res* **45**: 1379-87 (2011)
- Cheng P, Gui C, Huang J, Xia Y, Fang Y, Da G, Zhang X: Molecular mechanisms of ampelopsin from *Ampelopsis megalophylla* induces apoptosis in HeLa cells. *Oncol Lett* **14**: 2691-8 (2017)
- D'Amato RJ, Lin CM, Flynn E, Folkman J, Hamel E: 2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 3964-8 (1994)
- Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, Gerez C, Guittet O: Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett* **421**: 277-9 (1998)
- Hashimoto T, Juso K, Nakano M, Nagano T, Kambayashi S, Nakashima A, Kikkawa U, Kamada S: Preferential Fas-mediated apoptotic execution at G1 phase: the resistance of mitotic cells to the cell death. *Cell Death Dis* **3**: e313 (2012)
- Kumei Y, Nakajima T, Sato A, Kamata N, Enomoto S: Reduction of G1 phase duration and enhancement of c-myc gene expression in HeLa cells at hypergravity. *J Cell Sci* **93** (Pt 2): 221-6 (1989)
- Madlener S, Illmer C, Horvath Z, Saiko P, Losert A, Herbacek I, Grusch M, Elford HL, Krupitza G, Bernhaus A, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T: Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett* **245**: 156-62 (2007)
- Nelson JM, Fry DW: Cytoskeletal and morphological changes associated with the specific suppression of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity in A431 human epidermoid carcinoma. *Exp Cell Res* **233**: 383-90 (1997)
- Pessina A, Raimondi A, Cerri A, Piccirillo M, Neri MG, Croera C, Foti P, Berti E: High sensitivity of human epidermal keratinocytes (HaCaT) to topoisomerase inhibitors. *Cell Prolif* **34**: 243-52 (2001)
- Reis MA, Ahmed OB, Spengler G, Molnar J, Lage H, Ferreira MU: Exploring jolkinol D derivatives to overcome multidrug resistance in cancer. *J Nat Prod* **80**: 1411-20 (2017)
- Stubbe J, Riggs-Gelasco P: Harnessing free radicals: formation and function of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase. *Trends Biochem Sci* **23**: 438-43 (1998)
- Sundquist T, Moravec R, Niles A, O'Brian M, Riss T: Timing your apoptosis assays. *Cell Notes* **16**: 18-21 (2006)
- Sutherland RL, Hall RE, Taylor IW: Cell proliferation kinetics of MCF-7 human mammary carcinoma cells in culture and effects of tamoxifen on exponentially growing and plateau-phase cells. *Cancer Res* **43**: 3998-4006 (1983)