

Válaszok Prof. Dr. Vereb György egyetemi tanár opponensi véleményére

Mindenekelőtt hálásan köszönöm Dr. Vereb György Professzor Úrnak azt a gondos, minden részletre kiterjedő munkát, amivel értekezésem opponensi véleményezését elvégezte. Kritikai észrevételei tanulságosak, segítenek abban, hogy további munkáim során az eddigieknél is határozottabban törekedjen a minőségközpontú tervezésre.

Az értekezéssel kapcsolatos észrevételekre, kritikai megjegyzésekre az alábbiakban szeretnék válaszolni.

1. Az észrevételezett megfogalmazási pontatlanságokat, szerkesztési hiányosságokat és gépelési hibákat természetesen elfogadom. Ezek jelenlétét azért is sajnálom, mert egyrészt csökkentik értekezésem színvonalát, másrészt jelzik, hogy nem volt elégséges azon törekvésem, mellyel a mű megírása közben igyekeztem elkerülni az ilyen formai jellegű hibákat.
2. *„Hasznos lett volna néhány szemléltető ábra, valamint a 3. és 4. alfejezet végén röviden utalni arra, hogy a felvázolt háttértől milyen irányba indul tovább a kutatás ...”*

A bevezetésből hiányolt, a bemutatandó vizsgálatokra vonatkozó utalás biztosan segítette volna az eredmények átlátását, megértését. Részben az említett redundancia elkerülése miatt nem került ilyen előremutató rész a bevezetésbe, a bemutatott vizsgálatok összegzését ugyanis a diszkusszióban mindenképpen szükségesnek láttam. Emellett – jóllehet az MTA nem korlátozza az értekezés terjedelmét – igyekeztem azt racionális határok között tartani.

3. *„A bevezetésben felvetett némely gondolattal nem könnyű azonosulni. Így elsőként zavaró az alapmotiváció, amely a globális antiproliferatív terápia fejlesztésében, ehhez újabb vezérmolekulák megtalálásában jelöli meg a hatékony daganatterápia jövőjét. A célzott, molekuláris terápia már évtizedek óta hosszabb sikertörténete a specifikus hatású kezelésekre kell terelje a figyelmet, ennek megfelelően az antiproliferatív szerek esetén is azt célszerű vizsgálni, hogy mely célponton hatnak, hogyan lehet a hatásukat specifikusabbá tenni.”*

A tumorellenes terápia jövőjével kapcsolatban teljes mértékben osztom Professzor Úr véleményét, a molekuláris szinten célzott beavatkozásoké a jövő, ami természetesen megjelenik a kutatási trendekben is. A klasszikus, gyorsan osztódó sejtekre ható tumorellenes szerek kutatása nem tekinthető korszerű irányzatnak. Munkánk célja nem ilyen általános citotoxicitással jellemezhető újabb szerek keresése volt. Az általunk alkalmazott szűrővizsgálatok célja hatásos molekulák kiemelése volt, függetlenül azok támadáspontjától. A fellelt aktív molekulák hatásmechanizmusának megközelítése, ill. szelektivitásuk jellemzése képezte munkánk következő, az értekezésben is nagyobb hangsúlyt kapó részét. Az aktív molekulák keresésének ezen módját a szakirodalom „forward pharmacology” vagy „phenotypic drug discovery” néven említi. Általánosan elfogadott, hogy ez az irányzat kevésbé korszerű, mint a molekuláris targetekkel

történő interakciókból kiinduló ún. „reverse pharmacology” (Wang *et al.*, 2011, Atanasov *et al.*, 2015). Bízom azonban abban, hogy a korábbi megközelítésnek is lehet még létjogosultsága a hatóanyag-jelöltek keresésében, különösen az akadémiai szférában.

4. *„A növényi eredetű biofarmakonok eddig felderítetlen spektrumának szélességére tett becslés a vonatkozó vélemények közül az optimista oldalt képviseli, ugyanis nem veszi figyelembe annak a statisztikus esélyét, hogy a még nem vizsgált növényekben talált farmakonok egy része már felderítésre került más, korábban vizsgált növények esetében, jóllehet saját tapasztalatai is ezt mutatják.”*

A növényvilág farmakológiai feldolgozottságára vonatkozó becslés optimista és jelentős a bizonytalansága. Ez utóbbit jól illusztrálja, hogy a magasabb rendű növényfajok számát illetően is meglepően nagy eltérések vannak a szakirodalomban; 250.000 és 500.000 közötti adatokat találhatunk (Fabricant and Farnsworth, 2001). A farmakológiai és fitokémiai feldolgozottság alacsony foka (mintegy 6, ill. 15%) miatt okkal bízhatunk abban, hogy a növényvilág még számos hatóanyagot, ill. prototípust rejt magában. Ezek minél hatékonyabb megtalálása a gyógyszerkutatás egyik kihívása. Egyetértek azzal a felvetéssel, hogy a lehetséges találatok számát csökkenti a már ismert természetes hatóanyagokból eredő redundancia. Ezt talán ellensúlyozhatják azok az utóbbi időben megerősödött kutatási irányzatok, melyek a hagyományosan kevésbé kutatott növényi források felé fordulnak. Ilyen újabb irányzat pl. az ún. extrémofil növények vagy a tengeri flóra vizsgálata farmakológiai szempontból (Bhatnagar and Kim, 2010, Sahli *et al.*, 2017).

5. *„A vegyületek hatásának leírása, még akkor is, ha ez szerkezet-hatás összefüggés-vizsgálat keretében történik, és feltárja, hogy a proliferáció-gátlásban apoptotikus, nekrotikus, és/vagy sejtciklus-szabályozással kapcsolatos folyamatok vesznek részt, deskriptívnek minősíthető. A vizsgált vegyületek támadáspontjáról, hatás-mechanizmusáról nem sokat tudunk meg.”*

A prezentált eredmények deskriptív jellegével kapcsolatban elfogadom az észrevételt, a lehetséges molekuláris szintű támadáspontig csak a ribonukleotid reduktázt gátló **8c** esetben jutottunk el. Bízom azonban abban, hogy a leírt kezelésfüggő változások (pl. sejtciklus eloszlásban, apoptotikus markerekben, fehérjék foszforilációjában) alkalmasak ígéretes vegyületek, ill. csoportok azonosítására, azok jellemzésére, ezáltal – ha indirekt módon is – lehet gyógyszerfejlesztési relevanciájuk.

6. *„Többnyire néhány adenocarcinoma sejtvonalra gyakorolt antiproliferatív hatással kerül szembeállításra az MRC-5 fibroblasztokra gyakorolt csekély hatás, és ennek mentén minősítenek vegyületeket „tumorselektívnek”. Ez a következtetés nem feltétlenül helytálló, hiszen a foetális eredetű fibroblasztokon végzett kísérletek nem helyettesítik a primer epitheliális sejtekkel nyerhető tapasztalatokat.”*

Az MRC-5 fibroblaszt, ill. immortalizált (hTERT-HME1) sejteken, valamint az alkalmazott tumor eredetű sejtvonalakon kapott antiproliferatív eredmények összevetésével egy közelítőleges adatot kaphatunk az adott vegyület szelektivitásáról, a hatás általános

jellegről. Egyetértek azzal az észrevétellel, miszerint az így kapott adat csak igen korlátozottan tekinthető a szelektivitás mértékének. Az *in vivo* vizsgálatokat magam is esszenciálisnak tartom, egy folyamatban lévő munkánk már tartalmaz ilyen eredményeket.

7. „A 12. oldalon alkaloidok „növényi sejtekre gyakorolt szuppresszor” hatásáról ír, de vajon milyen folyamatot szuprimálnak? Ugyanitt az „alkaloid a GTP-ázra hatva károsítja tumorsejt citoskeletonját”, de melyik GTP-ázra?”

A 12. oldalon említett szuppresszor hatás a narciklazin sejtosztódásra, ill. a sejt viabilitására vonatkozik. Az idézett közlemény szerint az alkaloid több GTP-ázra is hat, ezek között szerepel az elongációs faktor 1- α (eEF1 α) és a RhoA (Van Goietsenoven *et al.*, 2013).

8. „A 4.1 fejezetben az 1% antibiotikum-antimikotikum keverék és 1% L-glutamin helytelen, legfeljebb a megjelölt anyagok törzsoldatát adhatták 1:100 hígításban a médiumhoz. A végkoncentrációt így a dolgozatból nem lehet megtudni.”

A 4.1. fejezetben a sejtkultúra-alapú módszerek esetében elterjedt – bár nem teljesen pontos – módon jártam el: az általánosan használt törzsoldat hígításának mértékét adtam meg. Az antibiotikum-antimikotikum 10.000 egység/ml penicillin-K-t, 10.000 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin-szulfátot és 25 $\mu\text{g/ml}$ amfotericin B-t tartalmazott, míg az L-glutamin törzsoldat koncentrációja 200 mM volt. Mindkét törzsoldat 1:100 arányban került a médiumba.

9. „Az MTT teszt, különösképpen az itt alkalmazott végpontos változatában, nem használható a sejtprolifерáció egyértelmű mérésére önállóan, a sejtszám változásának követése nélkül, hiszen mindössze a vizsgált térfogatban adott időben jelenlévő össz mitokondriális aktivitást méri.”

„Kérdéses továbbá, hogy miért éppen 4 órás, MTT jelenlétében történő inkubációt választottak a méréshez, anélkül, hogy az egyes sejtvonalakra külön-külön optimalizálták volna az inkubációs időt, és validálták volna, hogy a sejtre jellemző mitokondriális aktivitás nem fogyasztja-e el az MTT szubsztrátot az inkubációs idő alatt, ezzel megghiúsítva a teszt linearitását, vagy nem termele a linárisan mérhető OD-t meghaladó abszorbcíót okozó formázán mennyiséget.”

A 4.2.1. fejezetben leírt MTT teszt a kezelt sejtpopuláció összesített reduktáz aktivitására ad információt, ami valóban nem feltétlenül arányos a sejtszámmal. A kísérleti paraméterek közül csak a kiindulási sejtszámot optimalizáltuk, két sejtvonal (MDA-MB-361 és C33A) esetében 10.000 sejt/üreg denzitással telepítettünk. A 4 órás MTT inkubáció egy általánosan használt irodalmi érték, melyet a módszer eredeti leírása kizárólagosan alkalmaz (Mosmann, 1983). Ezzel együtt biztosan hasznos lett volna több inkubációs idő alkalmazása a módszer optimalizálására.

10. *„Mivel a sejtek passzálása heti két alkalommal történt, ez elég nagy hígításokat feltételez; ilyen körülmények között 30 passzázsra vinni a sejtvonalakat számos buktatót rejt magában ...”*

Az adherens sejtek passzázsszámának növekedésével fokozódik az eredmények reprodukálhatatlanságának kockázata. Egyértelmű ajánlást nem találtunk a maximális passzázsszámra, de metodikai leírások jelentős része 20 passzázsra használja a sejteket, elvértve ennél jóval nagyobb értéket is közölni (Ujhelyi *et al.*, 2015). Mi a 30-ig terjedő passzázsszámmal nem tapasztaltunk ennek tulajdonítható inkohérens adatokat. A jövőbeli munkáink során célszerűnek tartom a 20-as maximum érték átvételét.

11. *„A látóterenkénti 150 sejt számolása, noha a magas elemszám miatt jónak tűnik, csak olyan kis nagyítás mellett valósítható meg, amely a másik célkitűzést, a nukleáris morfológia korrekt megítélését nem teszi lehetővé.”*

A látóterenkénti 150 sejt számolása monitoron történt a látótér fotózása után az elmentett képfájl felhasználásával.

12. *„A 4.7. fejezetben leírt PCR vizsgálatok tervezésében a GAPDH önmagában nem elegendő kontroll, részben mert legalább két, független háztartási gént kell választani és azokat egymásra is normálva validálni, részben mert a potenciálisan citotoxikus ágensek esetén nem szerencsés a sejtmetsabolizmusban résztvevő transzkript használata. Az itt kapott adatokból származtatott 10-30%-nyi mRNS szint csökkenés, mely a legtöbb mérésben bemutatásra került (pl. 16., 23. ábrák), jóllehet kellő esetszám mellett matematikailag szignifikáns különbséget jelent, szabályozási szinten önmagában csekély biológiai jelentőségű, mely jelentőséget tovább csökkenti, hogy a kiolvasás szemi-kvantitatív módon történt.”*

A PCR vizsgálatokra vonatkozó kritikai észrevételeket elfogadom, a PCR kísérletek eredményei valóban kevésbé konkluzívak. A tesztelt farmakonok egy részében történtek protein-szintű vizsgálatok is (pl. **6a,b**, ill. **7a**), jóllehet a Western blot más célfehérjére irányult, így azok eredményei nem pótolják a két belső standarddal készült és szigorúbb módon interpretált PCR adatokat. Részben ezen opponensi felvetés alapján folyamatban lévő és tervezett munkáinkban jóval nagyobb szerepet kapnak a Western blot vizsgálatok, melyekkel meghatározhatók az egyes proteinek foszforilált és defoszforilált formái is, így igen hasznos többlet információhoz vezethetnek (pl. CDK1, CDC25).

13. *„A 4.14 fejezetben leírt módszer nem önmagában a ribonukleotid reduktáz aktivitását méri, hanem az RNR aktivitásának, a DNS polimeráz processzivitásának és az S fázisban lévő sejtek arányának a közös eredményét (illetve ezek egymástól való részleges függetlensége esetén a konvolúcióját), melyre a proliferáción kívül a DNS károsodás és javítás folyamata is hatással van.”*

A [¹⁴C]citidin DNS-be történő beépülésének gátoltságát a szakirodalom egy jelentős része – a valós helyzetet jelentősen leegyszerűsítve – a ribonukleotid reduktáz

gátlásának tulajdonítja, ennek alapján értelmeztem a kapott adatokat jómagam is (Chimpoy *et al.*, 2013, Graser-Loescher *et al.*, 2017). A módszert az optimalizációt publikáló szerzők a ribonukleotid reduktáz aktivitásának meghatározására alkalmas metodikaként közölték (Jong *et al.*, 1998). Ezzel együtt úgy gondolom, hogy a diszkusszióban célszerű lett volna kitérnem a [¹⁴C]citidin hasznosulásának összetettségére.

14. „A statisztikai értékelés leírása meglehetősen szűkszavú, és ebben a formában bizonyosan helytelen, hiszen az ábrákon a kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltérések kerültek jelölésre, s ennek alapját bizonyára valamilyen, a dolgozatban meg nem nevezett post hoc teszt képezte.”

Kísérleti eredményeink statisztikai értékelésére végzett varianciaanalízist Dunnett, ill. Newman-Keuls post hoc teszttel végeztünk, az ábrákon megadott szignifikancia értékek ezekből származnak.

15. „A bemutatott Hoechst-PI festés eredmények, bár vizuálisan is értékelhetőek, minden esetben igényelnék a kvantitálást (szerencsére volt, ahol ez megtörtént). A normál fibroblaszt kontroll bemutatása hiányzik a 3., 12., 41., 45., és 48. ábrán.”

A fluoreszcens festést nem végeztük el minden esetben fibroblaszt sejteken is, így a **2f–h**, **1i**, **6a–d**, **12a**, **13a,b** és **14a–d** tesztanyagok esetében. Ezek nagyobb részében a tumorszelektivitás jellemzésére elégségesnek ítéltük a fibroblasztokon, ill. immortalizált sejtvonalon (hTERT-HME1) kapott viabilitási eredményeket. A **14c** és **14d** szeszkviterpének esetében az izolált anyagmennyiség korlátolt volta miatt kellett lemondanunk a tervezett vizsgálatok egy részéről.

16. „A 16. ábrán bemutatott kb. 20%-os p16 ciklininhibitor mRNS szint növekedés kismértékűnek tűnik ahhoz, hogy önmagában megmagyarázza a BrdU inkorporáció és 24 órás mérésben az S fázisú sejtek arányának bemutatott mértékű csökkenését.”

A p16 tumor szuppresszor 16. ábrán bemutatott mRNS-szintű változása valóban nem magyarázza a BrdU beépülésben és a sejtciklusban észlelt kezelésfüggő változásokat. A géncsendesítés technikáját eddig nem alkalmaztuk, de – részben az opponensi felvetés kapcsán – tervezzük az módszer beépítését munkacsoportunk metodikai spektrumába.

17. „A 41. oldalon szerepel a „fázisátmenetet facilitáló retinoblasztóma protein” kifejezés, amely nem túl szakszerű, és a fehérje alapvetően tumorsuppresszor jellegű funkciója miatt is félreérthető. Kérdéses, hogy a Rb mRNS csökkenése hogyan függ össze az S fázisba lépés gátlásával és a BrdU inkorporáció csökkenésével, hiszen ennek tankönyvi adatok alapján éppen az ellenkezőjét várnánk. ...”

A retinoblasztóma (Rb) protein fehérje-szintű expressziójának prezentálása valóban precízebb kiértékelést és óvatosabb diszkutálást igényelt volna. A protein ismert funkciójából indultam ki, miszerint a foszforilálatlan forma gátolja a sejtciklus progresszióját, így magyarázhatja a sejtciklus eloszlásában és a BrdU beépülésben tapasztalt változásokat. Ezt az esetleges magyarázatot azért éreztem elfogadhatónak,

mert a kezelések **(6a és 6b)** jóval nagyobb mértékben csökkentették a foszforilált formát, mint az összes fehérjét, tehát csökkentették a Rb foszforiláltságát. Elfogadom, hogy az Western blot eredmények gondos kvantitálása robosztusabb következtetést tett volna lehetővé.

18. *„A 21. és 22. ábrák megbeszélésének gondolatmenetét ellentmondásosnak érzem: mind a paclitaxel, mind a 2ME M-fázisbeli akkumulációt okoz, de közülük a taxol serkenti, a 2ME pedig gátolja a tubulin polimerizációt. Ennek alapján a D-homoösztron H3 hiszton-foszforilációt gátlóhatása nem következhet annak MT polimerizációra gyakorolt hatásából. ...”*

A D-homoösztron hiszton H3 foszforilációra gyakorolt hatása alapján azért tartottuk célszerűnek megvizsgálni a tubulin polimerizációjára gyakorolt direkt hatást, mert a polimerizációt bármilyen irányba eltolva hasonló sejtciklus zavart kaphatunk (Nakagawa-Goto *et al.*, 2016, Huang *et al.*, 2018). Egyetértek azzal az észrevétellel, miszerint a D-homoösztron tendenciaszerűen csökkenti a tubulin polimerizáció sebességét, így a vegyület direkt hatása nem zárható ki. A duplikátumban végzett munkát a kit gyártói ajánlásán túl azért tartottuk elfogadhatónak, mert az assay nem sejt alapú, így közelebb áll a tisztán kémiai reakciókhoz (mint pl. a DPPH assay; 4.11.), mint az általunk végzett *in vitro* vizsgálatok többsége. Elfogadom, hogy a p21-p53 tengelyre gyakorolt hatás feltárása tanulságos lett volna.

19. *„A 28B. ábra értelmezését segítette volna, ha azon a kombinációs kezelések mellett a releváns önálló kezelések (szolanidin származékok és doxorubicin) hatása is fel lett volna tüntetve.”*

A doxorubicin és szolanidin analógok kombinációs vizsgálatainak bemutatásakor valóban hasznos lett volna minden önálló kezelés hatását is feltüntetni (26. ábra B panel). Az alkalmazott 0,1 μ M-ban a doxorubicin mintegy 7%-ban gátolja az alkalmazott sejtek proliferációját. Ez az adat sajnálatos módon csak az alapul szolgáló és idézett közleményben szerepel (Zupkó *et al.*, 2014). A bemutatott kísérlet sor a vegyületek rezisztenciára gyakorolt hatására koncentrál, azok önálló antiproliferatív hatását csak a kombinációban hatásos vegyületek esetében határoztuk meg (**8c**, **8e** és **8h**). A többi vizsgálat vegyület doxorubicin jelenlétében is szerény – többnyire jóval 50% alatti – hatást mutatott, így önálló hatásukat nem tekintettük relevánsnak.

20. *„Ellentmondásnak látszik, hogy a 8c azonos dózisa a 24. órára emelte az S és a G2/M sejtek arányát (30. ábra), bár a 3H-citidin beépülés csökkent (32. ábra). Ez valószínűleg azzal oldható fel, hogy a ciklusbeli arányok relatív mutatók az összes mért sejthez képest, míg a 3H-citidin beépülést 5 millió életben maradt sejtől mérték, ignorálva az elpusztultakat.”*

A **8c** vegyület sejtciklusra és ^3H -citidin beépülésre gyakorolt hatása közötti ellentmondás nem oldható fel azzal, hogy az utóbbi módszer eredménye ignorálja az elpusztult sejteket. Ugyanis 24 órás behatás esetén a vegyületnek számottevő antiproliferatív hatása nincs (Minorics *et al.*, 2011). Így különösen indokoltnak tartom azon opponensi kritikát, miszerint a vegyület hatásmechanizmusának teljesebb

feltárása további vizsgálatokat igényelt volna. Az említett kísérleteken kívül a tubulin polimerizációra gyakorolt direkt hatás is konkluzív lehet. Elképzelhető, hogy a **8c** ³H-citidin beépülésre gyakorolt hatása kevésbé releváns, ugyanakkor a tubulinra hatva G2/M blokádot okoz 24 órás inkubációkor. Jelenleg folyamatban lévő vizsgálataink szerint egyes androsztán származékok fokozzák a tubulin polimerizációját és hasonló sejtciklus blokádok okoznak.

21. „A 39. ábrán bemutatott apoptózis méréseknek az extrém magas 11a és 11d dózisok mellett nincs sok értelme, ugyanakkor a limfóma sejtek szaporodását igen hatékonyan gátló 11c vegyület proapoptotikus hatását nem vizsgálták. A vegyületek és dózisaik egyes kísérletekre történő kiválasztása ezek miatt átgondolatlanak tűnik.”

A **11a** és **11d** alkaloidok 60 µM-ban történő vizsgálata valóban kevésbé konkluzív, továbbá a **11c** a limfóma mellett az adherens sejtvonalakon is kedvezőbb hatást mutatott, részletesebb vizsgálatára mégsem került sor. Ennek oka ezúttal is a rendelkezésre álló csekély mennyiség volt. Az alkaloid (pretazettin) kereskedelmi forgalomban nem szerezhető be, az általunk vizsgált minta növényi izolátum volt és az SZTE Farmakognóziai Intézete bocsátotta rendelkezésünkre.

22. „A 63. oldal első bekezdésében a hTERT-HME1 12a-ra vonatkozó IC₅₀ értékét (5,9 µM) a referenciaként alkalmazott ciszplatin 2,0 µM-os értékével veti össze, holott a két vegyületnek várhatóan nem azonos a hatásmechanizmusa. Egyébként is, a releváns összehasonlítást tumorszelektivitás szempontjából a malignus és nem malignus epiteliális sejtvonalak között kellene végezni.”

A **12a** vegyület tumorszelektivitását természetesen a tumorsejteken és az immortalizált sejten kapott IC₅₀ értékek összevetésével kívántam jellemezni. Ezek az értékek 2,3–12,9 µM, ill. 5,9 µM voltak. Ezek alapján legfeljebb az MBA-MD-231 és az A431 sejtek esetében beszélhetünk szelektív hatásról, ezeken a **12a** IC₅₀ értéke 2,3 ill. 3,0 µM volt. A ciszplatin hTERT-HME1 sejten mért IC₅₀ értékével (2,0 µM) azt kívántam bemutatni, hogy a **12a** alkaloid szelektivitási adatai összevethetők a referenciaként alkalmazott és a klinikumban is használt hatóanyag mért értékeivel.

Azonos hatásmechanizmussal ható referenciavegyületet nem használhattunk, mivel a tesztanyagok hatásmódja nem volt ismert. A ciszplatint, mint egy jól ismert tumorellesztő szert használtuk az alkalmazott sejtvonalak érzékenységeinek bemutatására.

23. „A 63. oldalon így fogalmaz: „Az alkaloidok összességében a HeLa sejtvonalra gyakorolták a legmarkánsabb hatást, amiben kiemelkedik a 12g.” Mivel a 12g vegyületet nem vizsgálták az MDA vonalakon és a T47D-n, kiemelkedősége nem lehet bizonyos. Az MDA-MB-231-re a 12a jobban hatott, mint a HeLa-ra, tehát elképzelhető, hogy a 12g is hatékonyabb az MDA-MB-231 gátlásában.”

Elfogadom Opponens kritikai észrevételét a **12a–h** alkaloidok sejtosztódásra gyakorolt hatásaival kapcsolatban. A **12g** vegyületet (arborinint) 3 sejtvonalon nem vizsgáltuk, így valóban állapítható meg, hogy az a HeLa sejtekre gyakorolja a legmarkánsabb hatást. A rendelkezésünkre álló anyagmennyiség ezúttal is limitált volt, ezért nem teljes a

bemutatott adatsor.

24. „A 41. ábráról nem lehet a szövegben leírt, apoptózisra utaló morfológiai jeleket leolvasni, és az ott alkalmazott kezelési dózisok a citometriás mérésben nem okozzák jelentős szub-G1 frakció megjelenését.”

A fluoreszcens kettős festés eredményéről készült fotók jellemzően kevésbé adhatók vissza nyomtatásban, ill. vetítésben, monitoron történő kiértékelésre azonban alkalmasnak találtuk. Igaz ez a 41. ábrára is, így az nem támasztja alá az arról írt szöveges értékelést. A festés során alkalmazott 10 μ M még nem okozott emelkedést a szubG1 állományban, ennek magyarázataként feltételeztük, hogy ebben a kondícióban a magállomány már kondenzálódik, erősebb fluoreszcenciát ad, de a DNS még nem eliminálódik a sejtből, így nem jelenik meg a hipodiploid populációban. Nagyobb koncentrációban (30 μ M) már észleltük az emelkedett szubG1 állományt (42. ábra).

25. „A 42A és 42B ábrák értelmezése kapcsán azt írja, hogy a „kezelés ... emelte az S fázis volumenét”. A diszkusszióban egy hasonló vegyülettel kapcsolatos irodalmi adatok alapján a G1-S átmenet zavarát és a DNS szintézis gátlását jelöli meg lehetséges okként, azonban ennek ellentmond az S fázis felszaporodása. A G1-S-G2/M arányok eltolódása inkább az S fázisban történő megrekedésre utalnak, ami megengedett G1-S átmenetre, és S-fázis ellenőrzési pont aktiválódására utal, melyet okozhat pl. lezáratlan replikációs villa, replikálatlan DNS, vagy a nukleosómális összeszerelő elmaradása.”

Elfogadom, hogy az S fázis emelkedését nem célszerű összefüggésbe hozni a G1→S átmenettel. Az idézett közlemény szerzői egy komplex hatásmechanizmusú szer vizsgálata során tapasztalták az S populáció növekedését és a G1→S átmenet gátoltságára utaló biokémiai eltéréseket (Leonce *et al.*, 2001). Racionális megfontolások alapján nagyon is kézenfekvő az az opponensi megjegyzés, miszerint az S fázis növekedése inkább funkcionáló G1→S átmenet mellett képzelhető el.

26. „A 66. oldal második bekezdésében leírt 13%-os és 14%-os ABCB1 mRNS szint csökkenés biológiailag jelentéktelennek tűnik. ...”

Egyetértek azzal, hogy az ABCB1 mRNS-szintű 15% alatti csökkenése nem magyarázza a 65-66. oldalon leírt szinergizmust. Ezért az értekezésben igyekeztem az idézett eredmények megadása mellett azokat mértéktartóan interpretálni. Elfogadom, hogy a leírt szinergizmus módjának, mechanizmusának tisztázása további vizsgálatokat kíván.

27. „A 49. ábrán, ill. annak ábraszövegében nincs feltüntetve, hogy a fehér oszlopok jelölik a kontrollt. Ugyanez az ábra a 48 órás kezelések esetén bemutatja a G1, S, és G2/M fázisok arányával együtt a szub-G1 sejtek arányát is. Ezeket az arányokat összeadva azonban nem 100%-ot kapunk, hanem jelentősen többet!”

A 49. ábra magyarázata sajnos valóban nem teljes, abból kimaradt, hogy a kezeletlen kontrollt fehér oszlopok jelzik, ez csak az alsó panel feliratán látható. A sejtciklus eloszlást bemutató panelek nem tartalmazzák a hipodiploid sejteket, mert ezt a populációt a kiértékeléshez használt program (ModFit LT) külön adja meg. Így a

sejtciklus paneleken az azonos színű oszlopokat összegezve 100%-t kapunk.

28. *„Összességében több olyan ábrát mutat be a dolgozat, ahol néhány (5-25) százalékos változást a szerző matematikai alapon szignifikánsnak minősít, belőle mechanisztikus következtetést von le, azonban az eredmény valódi biológiai jelentőségét további (leszabályozást, specifikus gátlást vagy aktiválást, megfelelő kontroll sejtvonalat, stb. alkalmazó) kísérletekkel nem támasztja alá, ill. alternatív, vagy párhuzamos folyamatok lehetőségét nem tárja fel.”*

A viszonylag szerény (5-25%) kezelésfüggő változásokra, ill. azok interpretálására vonatkozó kritikai megjegyzést elfogadom, ezeknek farmakológiai jelentőséget csak független módszerekkel történt megerősítés után célszerű tulajdonítani. Ezek az okkal kifogásolt eredmények jellemzően PCR vizsgálatokból származnak. Részben jelen észrevétel hatására folyamatban lévő és későbbi vizsgálatainkban jobban kihasználjuk a Western blot módszer előnyeit.

29. *„A Diszkusszió fejezet sok tekintetben ismétli az eredmények során már leírtakat, ugyanakkor az olyan komplex folyamatokat, mint a sejtciklus, vagy az apoptózis, bizonyos fokú egyszerűsítésekkel kezeli. ...”*

A diszkusszióban igyekeztem a bemutatott eredményeket részben a vizsgálatokat megalapozó előzmények, részben más munkacsoportok hasonló eredményeinek fényében értékelni. Céлом volt az ismétlések kerülése, ill. minimalizálása, egy szerény mértékű redundanciát ugyanakkor elfogadhatónak tartok. A vizsgált molekulák gyógyszerjelöltként történő, ipari szereplő által végzett további fejlesztése kevésbé életszerű. Ennek oka jelentős részben éppen az azok hatásait leíró publikáció. Meggyőződésem ugyanakkor, hogy az értekezésben bemutatott munkákkal olyan eredményeket sikerült elhelyeznünk a nemzetközi tudományos térben, ami indirekt módon hozzájárulhat – ideális esetben a regisztrációig eljutó – újszerű hatóanyagok tervezéséhez és fejlesztéséhez.

30. *„A 83. oldalon leírt okfejtés, mely a p53 stabilizálását jelöli meg a 7a vegyület hatásmechanizmusaként tárgyi tévedést és logikai hibát tartalmaz. Abból, hogy két teljesen különböző hatásmechanizmusú készítmény (transzkripciót gátló aktinomicin D és nukleáris exportot gátló leptomicin B) hatására két különböző sejtben a p53 eltérő módon stabilizálódik, nem következik az, hogy az egyik sejtben ugyanez a p53 egy harmadik féle vegyület célpontja. Azt pedig, hogy a roszkovitin szelektíven HeLa sejteken fejtené ki tumorellenes hatását, már az eredeti közlemények sem támasztják alá, és az erre példaként idézett közlemény sem szól erről.”*

Elfogadom, hogy a **7a** vegyület feltételezett hatásmechanizmusának leírása (83. old.) nem eléggé szabatos. A roszkovitin HeLa sejtekre szelektív hatása nem támasztható alá az idézett közleménnyel (Wesierska-Gadek et al., 2008). A közlemény szerzői írnak ugyan a roszkovitin HeLa₃ sejteken észlelt szelektív hatásáról, ám ez a szelektivitás nem más sejtvonalakkal történt összehasonlításra vonatkozik, hanem arra, hogy a vegyület jelentős direkt citotoxicitás nélkül reaktiválja a p53-t.

A másik idézett közleményben a szerzők öt sejtvonalon vizsgáltak egy aszkorbinsav

származékot és a legmarkánsabb hatást a HeLa sejteken kapták (Zhang *et al.*, 2011).

A következőkben az opponensi véleményben feltett kérdésekre szeretnék választ adni.

1. „A 3-metoxi-ösztadiol antiproliferatív hatásának vizsgálata során az **1f** és **1h** erősebb gátlást fejtett ki, mint a **2h** (5. táblázat), ezeket miért nem tekintették érdemesnek a további vizsgálatra?”

Az 5.1.1. fejezetben bemutatott 16-triazolil-ösztán származékok közül a HeLa sejteken kapott IC₅₀ alapján az **1f** és **1h** érdemes lett volna további vizsgálatokra. Eredményeink szerint a 17-es helyzetű hidroxilcsoportra β térállása kedvezőbbnek bizonyult, ezért választottunk ezek közül három vegyületet (**2f–h**), míg a 17 α -hidroxilcsoportot tartalmazó analógok közül egyet, a mindhárom sejtvonalon kedvező IC₅₀ értéket adó **1i**-t további *in vitro* tesztekre.

2. „Ugyanitt (és a 13 α -ösztroon sorban is), mivel magyarázható nagyobb dózisoknál az S-fázisban lévő sejtek arányának növekedése, ami ellentmond az antiproliferatív hatásnak, és a csökkent Cdc25B expresszióknak is?”

A S-fázis gyarapodása a Cdc25B expressziójának mérsékelt mRNS-szintű csökkenésével nem várt eredmény. Az értekezésben ezzel kapcsolatban idézett közlemény szerint a faktor expressziójának emelkedésekor jelentősen fokozódik a G2/M populáció, kevésbé az S-fázis (Gabrielli *et al.*, 1996). A szakirodalomban ugyanakkor nem példa nélküli az általunk leírt jelenség. Egy növényi szteroid glikozid SCC-15 laphámrák sejteken csökkentette a Cdc25A, -B és -C fehérje-szintű expresszióját és jelentősen fokozta az S és G2/M populációk arányát. A szerzők az észlelt hatásokat a p38 aktivációjával hozzák összefüggésbe, ami Cdc25 izoformák gátlásán keresztül a CDK1 – ciklin B komplex gátlását eredményezi (Ke *et al.*, 2016). Hasonló jelenséget váltott ki a kriptolepin laphám sejtvonalakon (SCC-13 és A431), kiegészülve a ciklin A, D1 és E downregulációjával (Pal and Katiyar, 2016). Saját eredményeinkkel kapcsolatban is valószínűsíthető a további ciklinek expressziójának befolyásolása. Emellett nem zárható ki, hogy a CDK1 – ciklin B komplexre gyakorolt hatásból eredő G2/M blokádnak megmutatkozik az S-fázisban is.

3. „Ugyanezen vegyületek vizsgálata kapcsán vajon mivel magyarázható a CDK1 mRNS csökkenése? (6. ábra)”

Ismert, hogy a ciklindependens kinázok proteinszintű expressziója állandó a sejtciklus során, ugyanakkor a farmakológiai beavatkozásra történő hasonló változás nem példa nélküli (Yang *et al.*, 2017, Su *et al.*, 2018). A tapasztalt mRNS-szintű változás oka, mechanizmusa nem ismert, a korábban (észrevételekre adott válasz, 28. pont) leírtak alapján biológiai relevanciája nem meghatározó. Az expresszióra vonatkozó vizsgálatainkat a későbbiekben fehérje-szinten tervezzük elvégezni.

4. *„Van-e arra a tendenciára magyarázat, hogy a 3-metoxi-ösztadiol származékok 17béta-OH, míg a 13α-ösztion sor tagjai 17alfa-OH sztereomér formában gátolták hatékonyabban a proliferációt?”*

A 17β-OH csoport mellett kifejezettebb hatást mutató 3-metoxi-ösztadiol származékokkal (**1a–l**, **2a–l**) szemben a 13α-ösztion sor vizsgált elemei (**5a–e**) minden esetben 3-benzil szunsztituenst tartalmaztak, aminek meghatározó szerepe lehet az antiproliferatív hatás kiváltásában. Ebben látjuk a konfiguráció-függő hatásbeli eltérések lehetséges okát.

5. *„A 14. ábra kapcsán ezt írja: „...a gátlás mértéke meghaladta az azonos koncentrációban (10 μM) alkalmazott ciszplatin hatását. Ebből arra következtethetünk, hogy 6a és 6b direkt módon gátolja a DNS szintézisét.” Miként következik a direkt hatás vélelme a ciszplatinénál erősebb hatásból?”*

Az észlelt hatások kvantitatív elemzéséből általában nem következtethetünk a hatás módjára, ez természetesen jelen esetben is érvényes. A megfogalmazás nem kellően szabatos, a direkt hatást a BrdU tumorsejtekbe történő beépülésének gátlására vezettük vissza, a ciszplatint referenciavegyületként alkalmaztuk.

6. *„Miért a ciszplatin képezte a referencia standardot, annak ellenére, hogy annak ismert hatásmechanizmusa feltehetőleg nem áll kapcsolatban a tesztelt vegyületek hatásmechanizmusával? (Ez vonatkozik a ciszplatin standardként történő felhasználására a dolgozat további részeiben is.)”*

A vizsgált vegyületek pontos hatásmechanizmusa nem ismert, így le kellett mondanunk arról, hogy hatásmódban azonos referenciavegyületet használjunk. A ciszplatin klinikai relevanciával is rendelkező, jól ismert hatóanyagként került kiválasztásra. Az új vegyületeket hatásainak kvantitatív bemutatására (pl. IC₅₀ érték) véltük célszerűnek az általános ismert standard használatát.

7. *„Mivel magyarázható, hogy a szolanidin származékok közül némelyik (8k) dózisának megtízszerezése akár 74-szeresére növelte, míg másoké (8f) akár 30-adára csökkentette a rodamin akkumulációt jellemző FA (fluoreszcencia arány) értéket (27. táblázat)?”*

A rodamin akkumulációs vizsgálat tapasztalatink szerint kevésbé kvantitatív szemléletű, a kapott eredmények gyakran nem mutatják a várt dózis-hatás összefüggéseket. Ezt más munkacsoportok is tapasztalták (pl. (Das *et al.*, 2016)). A legkézenfekvőbb magyarázat a magas alkalmazott koncentrációkban lehet (400 μM), ami a legtöbb tesztanyag esetében a rövid behatási idő miatt megengedhető. A tesztanyagok egy része azonban lehet toxikus a nagyobb koncentrációban, a károsodott membrán miatt drámaian csökkenhet a rodamin akkumulációja. Az ABC transzporterekre ható szerek hatásainak értelmezésekor figyelembe kell venni, hogy azok lehetnek szubsztrátok és inhibitorok, így nem meglepő, hogy az ABCB1 funkcionális vizsgálatok több hatóanyag is harang alakú dózis-hatás görbét produkál (Egido *et al.*, 2015). Mindenek alapján a rodamin akkumulációs vizsgálatok eredményeit nem kívántuk mennyiségileg értelmezni. Ehelyett két koncentrációban végzett mérések alapján ki kívántuk jelöli

azokat a származékokat, melyek interakcióba lépnek a transzporterrel, így várható azon keresztül kialakuló effektus, ami a szubsztrát hatásának módosulásában jelentkezik.

8. *„Ugyanitt a HL-60-ra kifejtett hatások vizsgálatához miért éppen a 8c, 9a, 9g vegyületeket választották, annak ellenére, hogy a 9a és 9g vegyületek citosztatikus hatása a kitapadó sejtekre elhanyagolható volt, és általában a 3-acetilezés egyébként is rontotta a hatást?”*

Az adherens sejteken leghatásosabbnak talált **8c** mellé indokoltnak láttuk kevésbé hatásos anyagok tesztelését leukémia sejteken, hogy képet kaphassunk az észlelt hatások általános jellegéről. Elfogadom, hogy a vegyületek kiválasztása nem volt kellően alapos, a leghatékonyabb vegyületek további vizsgálatával minden bizonnyal relevánsabb eredményekhez juthattunk volna.

9. *„A 30. ábra tanúsága szerint a 8c 6 mikromoláris koncentrációban 24 órás kezelés során emelte az S és a G2/M sejtek arányát, viszont az apoptotikus sejtek aránya ekkorra a kontroll szintjével volt azonos, míg a 8. órában még meghaladta a kontroll ötszörösét. Ismert-e adat a sejtciklus 8. órás értékeiről? Lehetséges-e a megfigyeléseket egy közös hatásmóddal magyarázni, vagy két eltérő hatással állunk szemben, amely eltérő szubpopulációkban okoz, eltérő időfüggéssel, G2/M blokkot és apoptózist?”*

A **8c** vegyület hatására apoptotikus HL-60 sejtek arányában látható ellentmondás okát abban látom, hogy a felvetésben szereplő két adatsor eltérő módszertannal készült, a két alkalmazott módszer eltérő időbeliséggel detektálja az apoptózis jelenségét. A 31. ábrán a **8c** 6 μM -ban már 8 óra után is megnövekedte az apoptotikus sejtek arányát. Az ábra Hoechst – propidium festés eredményét tartalmazza, a felvételek értékelésekor apoptotikusnak tekintettük a Hoechsttel intenzíven festődő sejteket, ami a sejtmag kondenzációjára utal, ám abból még nem feltétlenül történt DNS elimináció. A 30. ábra szerint ugyanez a koncentráció 24 órás behatás után nem emelte apoptotikus sejtek arányát, ám ez jelen esetben a szubG1 populációt jelenti. A sejtciklus analízis a DNS vesztést mutatja apoptotikus jegyként, ami a nukleáris kondenzáció után következik be. Szerencsésebb lett volna az eredmények leírásakor megadni, hogy adott esetben mit jelent az apoptotikus populáció. Sejtciklus analízist 8 órás expozíció után nem végeztünk.

10. *„A 17 β -HSD1 inhibitorok antiproliferatív hatásának vizsgálata kapcsán azt írja, hogy a „steroidmentesített médiumban tendenciaszerűen magasabb IC értékeket kaptunk, ám az eltérés nem nagyságrendnyi, így feltételezzük, hogy az antiproliferatív hatás létrejöttében az ösztrogének metabolizmusára gyakorolt hatás nem játszik szerepet”. Nem nyilvánvaló számomra, hogy ha a vegyületek eredeti célja a HSD gátlása, miért ítéli ezt a hatást, ami a teljes hatás mérhető része, semmisnek. Miért elvárás a nagyságrendnyi különbség a steroid-mentes és steroid tartalmú médiumban kifejtett hatások között? A kísérlet értékelése annyiból is bonyolult, hogy nem világos, a steroid megvonásnak önmagában milyen hatása volt a proliferációra, hiszen a bemutatott adatokból úgy tűnik, csak a steroid megvonást követő relatív inhibitor hatást mérték, a megvonás és az inhibitorok közös, kontrollhoz viszonyított hatását nem.”*

Meggyőződésem, hogy a vizsgált 17 β -HSD1 inhibitorok antiproliferatív hatásában nem játszik jelentős szerepet a megcélzott target bénítása. A standard médium ugyanis tartalmaz ösztradiolt, így a 17 β -HSD1 gátlása nem eredményezhet ösztrogénmegvonást. A szteroidmentes médiumban pedig az enzim szubsztrátja, az öszttron is hiányzik, a gátlásból ezért nem eredhet jelentős hatás. Így a kétféle médiummal elvégzett kísérletekből arra lehet következtetni, hogy a vegyületek hatása ösztrogének jelenlétében, ill. azok hiányában hasonló eredményeket adnak. A szteroidmentesítés proliferációra gyakorolt hatását nem vizsgáltuk. Az adatok utólagos értékelésekor azt találtuk, hogy kétféle médiumban mért kontroll abszorbanciák között nincs jelentős eltérés. A tesztanyagok hatékonyságában általában akkor várható vizsgálati körülményektől függő, jelentős eltérés, ha az adott körülmény meghatározza a hatást (pl. egy receptor jelenléte, ill. hiánya a vizsgált rendszerben). Ilyen esetekben gyakori a nagyságrendnyi eltérés a hatékonyságot leíró paraméterekben. Ezért az IC₅₀ értékekben mért eltérésekből arra következtettünk, hogy a tesztelt 17 β -HSD1 inhibitorok antiproliferatív hatásában az ösztrogének jelenlétének, ill. hiányának nincs meghatározó szerepe.

11. *„Ugyanitt mi lehet az oka, hogy a legtöbb vegyületre sem az MCF-7 sem az A2780, sem az MRC-5 sejtek nem voltak érzékenyek, csak a HeLa? Lehetséges-e, hogy az érzéketlen sejtvonalakban elsődleges szerepe nem az androsztendion – öszttron útvonalnak, hanem a HSD17B1 enzimet nem igénylő, tesztoszteronon keresztül előállított ösztradiolnak van? Mennyire specifikusak ezek az inhibitorok a többi HSD17 izoenzimre?”*

Az alkalmazott sejtvonalak expresszálják a 17 β -HSD1 enzimet, ám a fentebb említett megfontolások alapján nem feltételezünk meghatározó jelentőséget a vegyületcsoport antiproliferatív hatásában, így a HeLa sejtek érzékenységeiben sem. A HeLa sejteken mért tendenciózusan alacsonyabb IC₅₀ értékeket inkább a sejtvonal általános érzékenységeivel hozzuk összefüggésbe, ami a több vizsgált vegyületcsoporton, ill. vegyületen is megmutatkozott (pl. 16-triazolil-öszttronok, öszttron-16-oximook, D-homoöszttron). A tesztelt 17 β -HSD1 inhibitorok szelektivitásai adatait a szintézist végző munkacsoport publikálta (Marchais-Oberwinkler *et al.*, 2008, Bey *et al.*, 2009, Marchais-Oberwinkler *et al.*, 2011). A vizsgált vegyületek közül a **10c** két nagyságrenddel alacsonyabb IC₅₀ értékkel hat a 17 β -HSD1 enzimre, mint a 17 β -HSD2-re. Ez az eltérés a **10b**, **10d,c**, **10g,h** esetében egy nagyságrendnyi, míg a **10a** és **10f** nem szelektív. Az ösztrogén receptorokhoz egyik vegyület sem mutat jelentős affinitást.

12. *„A további, HeLa sejteken végzett sejtciklus vizsgálatok kapcsán felmerül a kérdés, hogy ha a 10b és 10c vegyületek gátolták a BrdU inkorporációt, hogyan fokozták egyszersmind az S fázisban lévő sejtek arányát a 48 órás mérésben. A 34. és 35. ábrán bemutatott kísérleteket lehet-e koherensen értelmezni, és belőlük egységes narratívát összeállítani arról, hogy a nyilvánvaló, és a 10e és 10f esetén kaszpáz aktiválás mérésével alátámasztott apoptózist az inhibitorok hogyan váltják ki, vagy, hogy a párhuzamosan megjelenő G1/S és G2/M blokk hogyan értelmezhető, és oka lehet-e valamelyik az apoptózis kialakulásának? Miért választotta az apoptózis vizsgálatához a 10e és 10f, míg a géneszpresszió vizsgálatához a 10a, 10b és 10f anyagokat, így egy vegyületre szűkítve az átfogóbb kép alkotásának lehetőségét?”*

A **10b** és **10c** vegyületek 24 órás behatás után csökkentette a BrdU inkorporációt, ami alátámasztja a sejtciklus analízisben talált csökkent S fázist. A két vegyület 48 órás inkubáció után emelte az S fázist. A vegyületek pontos hatásmechanizmusának feltárására nem elégségesek az elvégzett vizsgálatok. Az S populáció 24 órában tapasztalt általános csökkenése miatt a G1→S átmenetre koncentráltunk. A fázisátmenetet, mint támadáspontot alátámasztják a regulációs faktorok expresszióbeli változásai: a p53 és p21 tumorsuppresszorok expressziója fokozódott, a CDK2-é csökkent. Ezen effektusok relevanciáját csökkenti, hogy a változásokat csak mRNS-szinten mutattuk ki. A **10e** és **10f** vegyületek esetében a sejtciklus eredmények ismeretében indokolt lett volna a G2/M blokádnak kísérletes megközelítése is (pl. tubulin polimerizáció vizsgálata). A **10e** és **10f** esetében a kaszpáz-3 aktivitásának vizsgálatát az indokolta, hogy ezek idézték elő a legkifejezettebb szubG1 fokozódást, a **10a**, **10b** és **10f** vegyületek pedig a kifejezett S fázis csökkentő hatásuk miatt lettek géneszpresszió vizsgálatra kiválasztva. Elfogadom, hogy a vegyületek koncentráltabb kiválasztása meggyőzőbb konklúziókhoz vezethetett volna.

13. *„Ugyanitt miért az Rb és a CDK2 mRNS szintű expresszióját vizsgálták, és nem az aktiváltsági állapotukat (nem-foszforilált Rb, ciklin E koncentráció, E2F magi transzlokáció)?”*

Egyetértek a felvetéssel, a sejtciklust szabályozó faktorok egy részénél kevésbé releváns az mRNS-szintű expresszió, és mindenképpen indokolt a proteinszintű meghatározás, külön a foszforilált és nem foszforilált formákra. Korai kísérleteink során megelégedtünk az mRNS-szintű expresszió eredményeivel. Későbbi vizsgálataink alkalmával – így pl. a **6a** és **6b** vegyületek esetében – már fehérje-szinten detektáltuk az Rb és foszforilált Rb fehérjék mennyiségét.

14. *„Tekintve, hogy a 11c vegyület az egér limfóma sejten ABC transzporter hiányában igen hatékony volt, és a HL-60 humán leukémia sejteket is több más kísérletben sikerrel használták célpontként, felmerült-e a továbbiakban a 11c hematopoetikus malignitások iránti szelektivitásának és specifikus hatásmechanizmusának bővebb vizsgálata a HL-60, esetleg további hasonló sejtvonalak bevonásával?”*

A **11c** vegyület, a pretazettin valóban ígéretes hatásokat mutatott, további részletes vizsgálata több irányban is indokolt lett volna. Ezt azonban akadályozta a rendelkezésünkre álló korlátozott mennyiség, az alkaloid kereskedelmi forgalomban nem szerezhető be.

15. *„Lehet-e tudni, hogy a doxorubicinnel kombinált 11a, de főleg 11c kezelés esetén a szinergizmust inkább az ABC transzporter-működés gátlása, vagy a közvetlen (a doxorubicintól eltérő útvonalon ható) antiproliferatív hatás okozza?”*

A 4 kombinációban vizsgált alkaloid közül (**11a–d**) a **11c** mutatta a legkisebb inhibíciós indexet a checkerboard vizsgálatban, ám az interakció módjának feltérképezésére nem végeztünk további kísérleteket, részben a fent említett okok miatt.

16. „A **12a** IC50 értéke MCF7 és MDA-MB-231 esetén 4,5 és 2,3 μM , viszont számottevő apoptózis és valamelyes (nem túl nagy, bár matematikailag szignifikáns) kaszpáz-9 aktiválás csak 30 μM -nál látható. Ennek fényében tekinthető-e a proliferáció-gátlás lényeges elemének az apoptózis aktiválása?”

A **12a** vegyület, az izogravakridon-klorin szerény mértékben váltotta ki az apoptotikus markereket: a szubG1 populáció emelkedését és a kaszpáz-3 aktiválódását, így indokolt az a megállapítás, miszerint a vegyület antiproliferatív hatásában az alkalmazott sejtvonalakon az apoptózis indukciója nem meghatározó hatáselem.

17. „Mi lehet az oka, hogy az MDA-MB-231 sejtekben nem jön létre membrán permeabilizálás **12a** kezelés hatására, de az MCF7 sejtekben létrejön (41. ábra)?”

A fluoreszcens kettős festés eredményét az akridonvázis alkaloidok esetében kvantitatív módon nem értékeltük, célunk a nukleáris kondenzáció és a membránkárosodás kimutatása volt. Ez utóbbit csak az MCF7 sejteken tapasztaltuk. A két sejtvonal eltérő viselkedésének oka nem tisztázott, de feltételezhető, hogy az összefügg a két sejtvonal jelentős biokémiai eltéréseivel. Az MCF7 sejtek ugyanis a CASP3 gén deléciója miatt nem expresszálnak funkcionáló kaszpáz-3 enzimet (Janicke *et al.*, 1998). A sejtvonal ugyan képes apoptózisra, ám kézenfekvő, hogy sejtkárosító stimulusok, jelen esetben a **12a** kifejezettebb a nekrotikus sejtpusztulást okoznak, amit alátámaszt az általunk tapasztalt propidium felvétel.

18. „A Rutaceae növényfajokból izolált alkaloidok hatásvizsgálata szépen kivitelezett, és kerek történetet ad. Sajnálatos, hogy csak HeLa sejteken volt kimutatható jelentős hatás, ugyanakkor biztató, hogy MRC-5 sejtekre nem volt befolyással a **13a** és **13b** vegyület. Volt-e lehetőségük azóta más sejteken is tesztelni ezeket a vegyületeket?”

A vizsgált kinolinvázis alkaloidok (**13a–k**) is növényi eredetűek voltak, kivonásuk és azonosításuk az SZTE Farmakognóziai Intézetében történt. A rendelkezésre álló mennyiség ezekből is limitált volt, a két hatékony alkaloid kereskedelmi forgalomból nem szerezhető be. Ezért meg kellett elégednünk a bemutatott vizsgálatokkal. Opponens által felvetett vizsgálatok indokoltságát jelzi ugyanakkor, hogy más kutatócsoportok is vizsgálták ezeket a vegyületeket további adherens sejtvonalakon, ám az antiproliferatív hatás mechanizmusát kevésbé tárják fel (Richardson *et al.*, 2016, Suhaimi *et al.*, 2017, Zuo *et al.*, 2018).

19. „A szeszkviterpének vizsgálata során megfigyelhető egy G1/S blokk, de a ciklin E szintjét mégsem vizsgálták. Ugyanakkor mintegy 25%-kal csökkent ciklin B2 szintet mértek, amely csökkenés akkor értelmezhető egyértelműen megnövekedett G2/M frakció okaként, ha megkülönböztetjük a G2 és az M fázisban lévő sejteket. Történt-e ezirányú kísérlet, tekintve, hogy az alfejezet konklúziójaként a vegyületeket további vizsgálatokra érdemesnek tartották?”

A szeszkviterpének (**14a–d**) vizsgálatai során a sejtciklus eredmények birtokában a G2→M átmenetre koncentráltunk és ezt az effektust a **7a** vegyület (D-homoösztron) esetében elvégzett kísérletekkel szerettük volna jellemezni. A limitált anyagmennyiség

miatt sajnos ezek komplettálását sem tette lehetővé, így a további – az S populáció csökkenését magyarázó – kísérletekre nem került sor. Egyetértek Opponens felvetésével, különösen a **14a** vegyület esetében lenne indokolt a G1→S átmenet regulációjának vizsgálata.

Végezetül ismételtelen köszönöm Professzor Úr részletes értékelését, kritikai észrevételeit, tanácsait. Meggyőződésem, hogy mindez jelentősen hozzá fog járulni munkacsoportunk jövőbeli eredményeihez, kísérleteink tervezéséhez, munkánk minőségéhez.

Tisztelettel kérem az opponensi bírálatra adott válaszaim elfogadását.

Szeged, 2018. május 22.

Dr. Zupkó István
egyetemi docens

Hivatkozások

- Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, Temml V, Wang L, Schwaiger S, Heiss EH, Rollinger JM, Schuster D, Breuss JM, Bochkov V, Mihovilovic MD, Kopp B, Bauer R, Dirsch VM, Stuppner H: Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv* **33**: 1582-614 (2015)
- Bey E, Marchais-Oberwinkler S, Negri M, Kruchten P, Oster A, Klein T, Spadaro A, Werth R, Frotscher M, Birk B, Hartmann RW: New insights into the SAR and binding modes of bis(hydroxyphenyl)thiophenes and -benzenes: influence of additional substituents on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1) inhibitory activity and selectivity. *J Med Chem* **52**: 6724-43 (2009)
- Bhatnagar I, Kim SK: Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds. *Mar Drugs* **8**: 2673-701 (2010)
- Chimplooy K, Song S, Wheeler LJ, Mathews CK: Ribonucleotide reductase association with mammalian liver mitochondria. *J Biol Chem* **288**: 13145-55 (2013)
- Das U, Pati HN, Barath Z, Csonka A, Molnar J, Dimmock JR: 1-[3-(2-Hydroxyethylsulfanyl)propanoyl]-3,5-bis(benzylidene)-4-piperidones: A novel cluster of P-glycoprotein dependent multidrug resistance modulators. *Bioorg Med Chem Lett* **26**: 1319-21 (2016)
- Egido E, Muller R, Li-Blatter X, Merino G, Seelig A: Predicting activators and inhibitors of the breast cancer resistance protein (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1) based on mechanistic considerations. *Mol Pharm* **12**: 4026-37 (2015)
- Fabricant DS, Farnsworth NR: The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect* **109 Suppl 1**: 69-75 (2001)
- Gabrielli BG, De Souza CP, Tonks ID, Clark JM, Hayward NK, Ellem KA: Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. *J Cell Sci* **109 (Pt 5)**: 1081-93 (1996)
- Graser-Loescher G, Schoenhuber A, Ciglenec C, Eberl S, Krupitza G, Mader RM, Jadav SS, Jayaprakash V, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T, Saiko P: Thiosemicarbazone derivatives, thiazolyl hydrazones, effectively inhibit leukemic tumor cell growth: Down-regulation of ribonucleotide reductase activity and synergism with arabinofuranosylcytosine. *Food Chem Toxicol* **108**: 53-62 (2017)
- Huang X, Hua S, Huang R, Liu Z, Gou S, Wang Z, Liao Z, Wang H: Dual-targeting antitumor hybrids derived from Pt(IV) species and millepachine analogues. *Eur J Med Chem* **148**: 1-25 (2018)
- Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG: Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* **273**: 9357-60 (1998)
- Jong AY, Yu K, Zhou B, Frgala T, Reynolds CP, Yen Y: A simple and sensitive ribonucleotide reductase assay. *J Biomed Sci* **5**: 62-8 (1998)
- Ke JY, Zhang W, Gong RS, Cen WJ, Huang HQ, Li YR, Kong WD, Jiang JW: A monomer purified from *Paris polyphylla* (PP-22) triggers S and G2/M phase arrest and apoptosis in human tongue squamous cell carcinoma SCC-15 by activating the p38/cdc25/cdc2 and caspase 8/caspase 3 pathways. *Tumour Biol* **37**: 14863-72 (2016)

- Leonce S, Perez V, Lambel S, Peyroulan D, Tillequin F, Michel S, Koch M, Pfeiffer B, Atassi G, Hickman JA, Pierre A: Induction of cyclin E and inhibition of DNA synthesis by the novel acronycine derivative S23906-1 precede the irreversible arrest of tumor cells in S phase leading to apoptosis. *Mol Pharmacol* **60**: 1383-91 (2001)
- Marchais-Oberwinkler S, Kruchten P, Frotscher M, Ziegler E, Neugebauer A, Bhoga U, Bey E, Müller-Vieira U, Messinger J, Thole H, Hartmann RW: Substituted 6-phenyl-2-naphthols. Potent and selective nonsteroidal inhibitors of 17b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17b-HSD1): design, synthesis, biological evaluation, and pharmacokinetics. *J Med Chem* **51**: 4685-98 (2008)
- Marchais-Oberwinkler S, Wetzel M, Ziegler E, Kruchten P, Werth R, Henn C, Hartmann RW, Frotscher M: New drug-like hydroxyphenylnaphthol steroidomimetics as potent and selective 17b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors for the treatment of estrogen-dependent diseases. *J Med Chem* **54**: 534-47 (2011)
- Minorics R, Szekeres T, Krupitza G, Saiko P, Giessrigl B, Wölfling J, Frank É, Zupkó I: Antiproliferative effects of some novel synthetic solanidine analogs on HL-60 human leukemia cells in vitro. *Steroids* **76**: 156-62 (2011)
- Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63 (1983)
- Nakagawa-Goto K, Chen JY, Cheng YT, Lee WL, Takeya M, Saito Y, Lee KH, Shyur LF: Novel sesquiterpene lactone analogues as potent anti-breast cancer agents. *Mol Oncol* **10**: 921-37 (2016)
- Pal HC, Katiyar SK: Cryptolepine, a Plant Alkaloid, Inhibits the Growth of Non-Melanoma Skin Cancer Cells through Inhibition of Topoisomerase and Induction of DNA Damage. *Molecules* **21** (2016)
- Richardson JS, Sethi G, Lee GS, Malek SN: Chalepin: isolated from *Ruta angustifolia* L. Pers induces mitochondrial mediated apoptosis in lung carcinoma cells. *BMC Complement Altern Med* **16**: 389 (2016)
- Sahli R, Riviere C, Neut C, Bero J, Sahuc ME, Smaoui A, Beaufay C, Roumy V, Hennebelle T, Rouille Y, Quetin-Leclercq J, Seron K, Ksouri R, Sahpaz S: An ecological approach to discover new bioactive extracts and products: the case of extremophile plants. *J Pharm Pharmacol* **69**: 1041-55 (2017)
- Su G, Chen H, Sun X: Baicalein suppresses non small cell lung cancer cell proliferation, invasion and Notch signaling pathway. *Cancer Biomark* **22**: 13-8 (2018)
- Suhaimi S, Hong S, Abdul Malek S: Rutamarin, an active constituent from *Ruta angustifolia* Pers., induced apoptotic cell death in the HT29 colon adenocarcinoma cell line. *Pharmacogn Mag* **13**: 179-88 (2017)
- Ujhelyi Z, Kalantari A, Vecsernyés M, Róka E, Fenyvesi F, Póka R, Kozma B, Bácskay I: The enhanced inhibitory effect of different antitumor agents in self-microemulsifying drug delivery systems on human cervical cancer HeLa cells. *Molecules* **20**: 13226-39 (2015)
- Van Goietsenoven G, Mathieu V, Lefranc F, Kornienko A, Evidente A, Kiss R: Narciclasine as well as other Amaryllidaceae isocarbostryls are promising GTP-ase targeting agents against brain cancers. *Med Res Rev* **33**: 439-55 (2013)
- Wang B, Deng J, Gao Y, Zhu L, He R, Xu Y: The screening toolbox of bioactive substances from natural products: a review. *Fitoterapia* **82**: 1141-51 (2011)

- Wesierska-Gadek J, Wandl S, Kramer MP, Pickem C, Krystof V, Hajek SB: Roscovitine up-regulates p53 protein and induces apoptosis in human HeLaS(3) cervix carcinoma cells. *J Cell Biochem* **105**: 1161-71 (2008)
- Yang YL, Gong WY, Chen FF, Chen LC, Chen YT: pPeOp from *Omphalia lapidescens* Schroet induces cell cycle arrest and inhibits the migration of MC-4 gastric tumor cells. *Oncol Lett* **14**: 533-40 (2017)
- Zhang Z, Liu X, Wu T, Liu J, Zhang X, Yang X, Goodheart MJ, Engelhardt JF, Wang Y: Selective suppression of cervical cancer Hela cells by 2-O-beta-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L. *Cell Biol Toxicol* **27**: 107-21 (2011)
- Zuo Y, Pu J, Chen G, Shen W, Wang B: Study on the activity and mechanism of skimmianine against human non-small cell lung cancer. *Nat Prod Res* **in press**: doi: 10.1080/14786419.2017.1408096 (2018)
- Zupkó I, Molnár J, Réthy B, Minorics R, Frank É, Wölfling J, Molnár J, Ocsovszki I, Topcu Z, Bitó T, Puskás GL: Anticancer and multidrug resistance-reversal effects of solanidine analogs synthesized from pregnadienolone acetate. *Molecules* **19**: 2061-76 (2014)