



*Bírálat Zupkó István Természetes vegyületek és szintetikus szteroid analógok
antiproliferatív hatásának vizsgálata című MTA doktori értekezéséről*

A disszertáció a jelölt antiproliferatív hatású gyógyszerjelölt molekulák kutatása terén az elmúlt 10-12 évben végzett munkájának eredményeit mutatja be. A vegyületeket tekintve a merítés két nagy csoportra osztható; többféle szteroid analógot, valamint növényi alkaloidokat/kivonatokat vont szisztematikus vizsgálat alá. A szteroid analógok esetében tanulmányozta a szerkezet-hatás összefüggéseket, a növényi kivonatok esetében pedig bemutatja a hatásvezérelt frakcionálást, amivel a kivonat adott aktivitással rendelkező tartalomanyagai meghatározhatóak.

A vizsgálatok általános sémája a következő volt: a vegyületek szűrése antiproliferatív hatásra MTT teszttel; a potens antiproliferatív vegyületek esetében a sejtciklus-eloszlás vizsgálata; valamint a proapoptotikus hatás igazolása a jellegzetes morfológiai változások kimutatásával (fluoreszcens kettős festés alkalmazása) és a kaspázok aktivitásának mérésével. Ezt egészítette ki a tapasztalt sejtciklus eloszlás és az irodalmi adatok alapján valószínűsített, a sejtciklus szabályozásában szerepet játszó faktorok kifejeződésének vizsgálata, többnyire mRNS szinten. Egyes vegyületek esetében felmerült, hogy gátolhatják az MDR-transzporterek közvetítette rezisztenciát és ennek felderítésére is történtek vizsgálatok.

A tanulmányozott vegyületcsoportok kiválasztása megfelelően indokolt, az alkalmazott vizsgálómódszerek jól ismertek, széles körben alkalmazottak. A kísérletek kivitelezése nagyon pontos volt, a 3-4 párhuzamossal végzett mérések esetén is igen kicsi a szórás. 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. A hasonlóan megváltozott sejtciklus-eloszlás hátterének felderítésére esetenként más-más típusú vizsgálatokat végez. Az irodalmi

előzmények alapján választja ki ezeket, mégis talán lehetőség lett volna többfelé is vizsgáldni, szintetikus igénnyel tekinteni a különféle méréssorozatokra.

Általános észrevételeim, megjegyzéseim:

- Bár a citosztatikus és a citotoxikus hatás kifejezés alkalmazásában a szakirodalom sem igazán konzekvens, ezek szinonimaként való használata a dolgozatban helyenként zavaró, pl. a 7. oldal második bekezdésében („A klasszikus citotoxikus szerek terápiás korlátai jól ismertek; tumorszelektivitásuk a gyors osztódás gátlásán alapul, így kevésbé befolyásolják a lassan osztódó malignus sejteket, ugyanakkor kifejezetten toxikusak az élettanilag gyorsan osztódó sejtekre. Ez utóbbi tulajdonságból erednek a citosztatikumok általános mellékhatásai, pl. alopecia, csontvelő depresszió”).
- 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.
- A vegyületek antiproliferatív hatásának tumorszelektivitását a nem daganatos eredetű, de transzformált sejtvonalakon mért IC50 értékek alapján állapítja meg a szerző. Primer sejtkultúrán (pl. fibroblaszt, HUVEC) végzett mérés erre alkalmasabb lett volna.
- 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.
- Bár több vegyület esetében deklarálja a tumorszelektív antiproliferatív hatást, a daganatos és nem-daganatos sejteken kapott IC50 értékek között sokszor legfeljebb kétszeres az eltérés (néhány kivétellel, pl. a **8c** vegyület esetében HL-60 sejtre). Ekkora (és nagyobb) különbségek egyes vegyületeknek a különböző daganatos sejtvonalak esetében tapasztalt hatásereje között is van. A vizsgált vegyületek tumorszelektivitása többnyire csekély.
- A rezisztencia revertáló hatás kifejezést kerülném. Nem egzakt és magyarul nagyon rosszul hangzik.

Néhány konkrét észrevétel, megjegyzés:

- A szteroid analógok bemutatásánál a szerkezet-hatás vizsgálatok leírásának követését könnyítette volna, ha a szokásoknak megfelelően megadja a szénatomok számozását.
- 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 **7a** vegyület HeLa sejtekre szelektív antiproliferatív hatásának diszkussziójában felveti a p53 funkciójának helyreállítását/javítását. Végeztek vizsgálatokat ennek igazolására?
- 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?
- 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.
- Valóban elegendő lehet a transzporter expressziójának kb. 15%-os csökkenése (mRNS szinten) a doxorubicin hatás potencírozására a **12d** és **12e** vegyületek esetében?

Összességében megállapítható, hogy Zupkó István szisztematikus, jól átgondolt, a szakirodalom alapos ismeretével tervezett kísérleteket végzett antiproliferatív hatású vezérmolekulák megismerésére szteroid analógok és növényi hatóanyagok körében. A potens antiproliferatív hatású molekulák esetében a lehetséges hatásmód felderítésére további vizsgálatok is történtek. Eredményeit elismert szakmai folyóiratokban közölte.

Új tudományos eredményként fogadom el

- A szteroid analógok esetében tett fontos megállapításokat a szerkezet-hatás összefüggések vonatkozásában. A potens vegyületek proapoptotikus hatásának igazolását morfológiai módszerrel és a kaszpázok aktivitásának meghatározásával.
- Az öszttron-16-oxim származékok DNS-szintézist gátló hatásának és a G1→S átmenetet szabályozó faktorokra gyakorolt hatásának kimutatását.
- A D-homoöszttron HeLa sejteken szelektív, hormonális hatástól független antiproliferatív, proapoptotikus hatásának kimutatását.
- A szolanidin analógok antiproliferatív hatásának, valamint ABCB1 transzporter működését gátló és/vagy doxorubicin antiproliferatív hatását fokozó tulajdonságának kimutatását rezisztens limfóma sejteken. A leghatékonyabb szolanidin analóg antioxidáns hatásának, valamint a citidin DNS-be való beépülését gátló hatásának bemutatását HL-60 sejteken.
- Egyes 14β-HSD1 gátló hatású vegyület hormonális hatástól független sejtosztódás-gátló hatásának igazolását. A legpotensebb származékok esetében DNS szintézist gátló, proapoptotikus hatásuk kimutatását.
- Különböző növényi alkaloidok esetében a számos daganatellenes szerrel szemben kialakuló rezisztenciában szerepet játszó ABCB1 transzporter aktivitását gátló hatásuk és/vagy a doxorubicin antiproliferatív hatását fokozó aktivitásuk kimutatását rezisztens sejtvonalon.
- Néhány releváns növényfaj antiproliferatív hatásának szűrésére tervezett vizsgálattal, a hatásos extraktumok további, hatáskövető frakcionálásával eddig nem ismert vagy farmakológiailag kevésbé ismert természetes molekulák feltárását. Négy szeszkviterpén esetében proapoptotikus aktivitásuk, valamint a sejtciklus zavarát okozó szabályozó faktorok mRNS szinten megváltozott expressziójának kimutatását.

A fentiek alapján a benyújtott disszertációt nyilvános vitára alkalmasnak tartom.

Budapest, 2017. július 18.



Dr. Szökő Éva
egyetemi tanár