

## Válasz prof. Deli József opponensi bírálatára a

### ***Gyógynövények és növényi hatóanyagok biztonságossága és hatásossága fitokémiai és farmakológiai vizsgálatok tükrében c. doktori értekezéssel kapcsolatban***

Mindenekelőtt köszönöm Deli József Professor Úrnak értekezésem gondos, részletes átnézését és az erről kialakított pozitív véleményt.

Professzor Úr több helyen utal arra, hogy a bemutatott eredmények egy része témakörön kívüli. Opponenseimnek valóban olyan, tematikailag heterogén anyag bírálatát kellett elvégezniük, amely a munkájukat nem könnyítette. Úgy gondolom azonban, hogy az értekezés annak a – valóban sok részterületre osztható – interdiszciplináris munkának a tükré, amelyet a PhD-disszertációm elkészítése óta végeztem. A kémiai, farmakológiai és egyéb irányú vizsgálódások közös motivációja a gyógynövények, természetes anyagok jobb megismerése, azok biztonságos gyógyászati alkalmazását lehetővé tevő adatok nyerése.

Az értekezéssel kapcsolatos észrevételeire, kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

**Kérdés:** *Mi alapján választották ki a vizsgált növényeket? Teljesen más jellegű és más vidékről származó növények és más szerkezetű izolált vegyületek leírása található meg az 5.1. fejezetben. Mi a közös bennük?*

**Válasz:** A preparatív fitokémiai vizsgálatokban elemzett növények kiválasztásánál több cél és elvárás volt. A diterpén-alkaloidok a sisakvirág fajokra jellemző vegyületek, ezek tanulmányozásába már doktoranduszként bekapcsolódtam Hohmann Judit akadémikus irányításával. A Kárpát-medencei sisakvirág fajok vizsgálata volt első kutatási témám a doktori fokozatszerzés után, és ez a munka kiváló lehetőséget biztosított a preparatív növénykémiai technikákban való elmélyülésre, egyúttal több új vegyület izolálását eredményezve. A további témák egy-egy doktoranduszom kutatásaihoz kapcsolódtak. Az alkilamidok izolálásába a vegyületek az endokannabinoid-rendszerre kifejtett perspektívus hatásaira alapozva kezdtünk, egy *Heliopsis* és egy *Lepidium* fajjal végezve kutatómunkát. A *Cyclopia genistoides* vizsgálatára egy olyan kooperáció eredményeként került sor, amelyben lehetőségünk volt növényi mintákat beszerezni a Dél-Afrikai Köztársaságból. A *Ducrosia anethifolia* vizsgálatába is hasonló motivációból vágtunk bele: egy iráni doktoranduszom révén jutottunk hozzá az Iránban honos, kémiaiilag kevésbé vizsgált növény mintájához. A *Paraleucobryum longifolium* feldolgozására egy átfogó, mohafajok vizsgálatát célzó OTKA pályázat keretében került sor.

Ez a faj volt a legígéretesebb a farmakológiai szűrővizsgálatok során, a belőle kinyert, nagyon egyedi szerkezetű fenantrén-dimerek izolálása így nem egy vegyülettípusra célzott fitokémiai munka eredménye.

**Kérdés:** Valójában hány teljesen új szerkezetű vegyületet izoláltak?

**Válasz:** Az *A. toxicumból* kinyert akotoxicin (65), az *Aconitum moldavicum* gyökeréből izolált 1-O-dezmetil-szvatinint (74), a *Heliopsis helianthoides* var. *scabrából* tisztított és azonosított három izobutil- és metilbutilamid (90-92) és két arilbenzofurán neolignánt, az 1"-dehidroegonol-3"-metiléter (93) és az egonol-3"-metiléter (94), valamint a *Paraleucobryum longifoliumból* kinyert öt fenantrén (leukobrin A–E, 102–106) elsőként általunk leírt, új természetes anyagok. Összesen tehát 12 új vegyület izolálásáról és azonosításáról számoltam be értekezésemben.

**Kérdés:** Mi a magyarázata, hogy bár több *Aconitum* fajból izoláltak komponenseket, az *Aconitum carmichaelii* esetén csak analitikai vizsgálatokat végeztek?

**Válasz:** Az *Aconitum carmichaelii* a hagyományos kínai gyógyászat egyik legfontosabb gyógynövénye, ennek megfelelően számos kutatócsoport foglalkozott a nyers és feldolgozott gyökérdrogok vizsgálatával. A feldolgozott gyökérdrogból 100-nál több vegyületet azonosítottak, ezek zöme alkaloid és jelentős részüket már az általunk elvégzett vizsgálatok előtt leírták [1]. A gyógyászatban közvetlenül nem használt nyers gyökérdrogok összetétele is részletesen feltárt. Érdeklődésünk középpontjában ezért olyan, korábban relatíve elhanyagolt vegyületek voltak, amelyek izolálása klasszikus módszerekkel ugyan nem kivitelezhető, azonban azonosításukat követő félszintetikus előállításuk, majd farmakológiai vizsgálatuk segíthet megérteni a feldolgozott *A. carmichaelii* drogok hatását. Ezért foglalkoztunk a lipoalkaloidok vizsgálatával, beleértve azonosításukat, félszintetikus előállításukat és gyulladásgátló hatásuk mérését. Az egyéb, általunk vizsgált sisakvirág fajok kémiaiilag alig, vagy kevéssé voltak feltárva, így azok kutatása az új vegyületek azonosításának ígérését hordozta.

**Kérdés:** Hogyan állapították meg, hogy az *A. toxicumban* detektált lipoalkaloidok zöme, az izolált C18- és C19-alkaloidokkal ellentétben nem N-etil, hanem N-metilszubsztituenst tartalmaz, ha nem izolálták őket?

**Válasz:** A lipoalkaloidok szerkezetvizsgálatát HPLC-elválasztást követő tandem tömegspektrometriás vizsgálattal végeztük el. Ezek a vegyületek molekulaméret és polaritás szempontjából nagyon hasonlóak, így tiszta formában való kinyerésük nem volt megoldható. Ezért alkalmaztuk ezt a szerkezetmeghatározási módszert, amely a vegyületek fragmentálódásának vizsgálatán, és az eredmények szakirodalmi adatokkal való összevetésén alapult. Több korábbi vizsgálat során is ugyanilyen módszerekkel azonosítottak lipoalkaloidokat [2–4]. Vizsgálatainkat APCI módszerrel, pozitív ionizációs mód alkalmazásával végeztük. A lipoalkaloidok 800-900  $m/z$  értékkel és 35-40 perces retenciós idővel rendelkeztek az általunk alkalmazott kromatográfiás módszerben. A lipoalkaloidok ionizálása során a fragmentáció a zsírsavszubsztituens lehasadásával kezdődik, ezért a fő fragmension az  $MS^2$  spektrumban a  $[M + H - RCOOH]^+$ . A neutrális tömegvesztés a zsírsavnak felel meg, míg a fő fragmension az alapvázat határozza meg. Az 572, 586 és 588  $m/z$  értékű leányionok  $MS^3$  spektrumainak (amelyekben a legintenzívebb csúcsok  $CH_3OH/CO$  veszteségek eredményei) irodalmi adatokkal való összehasonlításával a vegyületek alapvázait 14-benzoilmezakoninnak, 14-benzoilakoninnak és 10-hidroxi-14-benzoilmezakoninnak azonosítottuk [3,4]. Ennél megbízhatóbb azonosítást tett volna lehetővé a tiszta vegyületek NMR-vizsgálata vagy autentikus standardokkal általunk elvégzett tandem tömegspektrometriás vizsgálatokkal való összevetés, erre azonban nem került sor.

**Kérdés:** *A szűrővizsgálatban a később részletes vizsgálatnak alávetett Paraleucobryum longifoliumon kívül analizált többi 41 faj esetén végezte-e analitikai vizsgálatokat, hogy mik lehetnek az aktív komponensek, vagy esetleg próbáltak-e vegyületeket izolálni? Ha nem, tervezik-e vizsgálni őket?*

**Válasz:** A szűrővizsgálathoz begyűjtött 42 taxon legtöbbször csak néhány grammos mennyiségű minta állt rendelkezésre. A vizsgált fajok közül a biológiailag legaktívabbak esetén LC-MS-MS módszerrel azonosítottuk azok karakterisztikus összetevőit. A fő komponenseket a KEGG Compound Database adataival összehasonlítva végeztük az azonosítást. Ennek a módszernek a hátránya, hogy csak ismert anyagok kimutatására alkalmas, továbbá, hogy az azonosított anyagoknak nincs feltétlenül számottevő szerepe a bioaktivásban. Kilenc fajból összesen 58 vegyületet, többségükben terpenoidokat azonosítottunk ily módon. A kémiai szűrővizsgálat eredményeit a cikk mellékletében közöltük [5]. A jövőben tervezzük további nagyobb mennyiségű növényi minták preparatív kémiai vizsgálatát.

Végezetül ismételten szeretném megköszönni Professor Úr részletes értékelését és észrevételeit.  
Tisztelettel kérem az opponensi bírálatra adott válaszaim elfogadását.

Szeged, 2021. november 3.

Tisztelettel:



Csupor Dezső

## Irodalomjegyzék

- <sup>1</sup> Zhou G, Tang L, Zhou X, Wang T, Kou Z, Wang Z. A review on phytochemistry and pharmacological activities of the processed lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debeaux. *J Ethnopharmacol* 2015; 160: 173–193 Im Internet: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25479152/>
- <sup>2</sup> Wang Y, Song F, Xu Q, Liu Z, Liu S. Characterization of aconitine-type alkaloids in the flowers of *Aconitum kusnezoffii* by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2003; 38: 962–970 Im Internet: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14505324/>
- <sup>3</sup> Wang Y, Shi L, Song F, Liu Z, Liu S. Exploring the ester-exchange reactions of diester-diterpenoid alkaloids in the aconite decoction process by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003; 17: 279–284 Im Internet: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12569436/>
- <sup>4</sup> Wang Y, Liu Z, Song F, Liu S. Electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the aconitines in the roots of aconite. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002; 16: 2075–2082 Im Internet: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12415539/>
- <sup>5</sup> Vollár M, Gyovai A, Szűcs P, Zupkó I, Marschall M, Csupor-Löffler B, Bérdi P, Vecsernyés A, Csorba A, Liktör-Busa E, Urbán E, Csupor D. Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Selected Bryophytes. *Mol* 2018, Vol 23, Page 1520 2018; 23: 1520 Im Internet: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/7/1520/htm>