

Válasz prof. Szőke Éva opponensi véleményére a
Gyógynövények és növényi hatóanyagok biztonságossága és hatásossága fitokémiai és
farmakológiai vizsgálatok tükrében c. doktori értekezéssel kapcsolatban

Mindenekelőtt hálásan köszönöm prof. Szőke Évának azt a gondos, minden részletre kiterjedő munkát, amivel értekezésem opponensi véleményezését elvégezte.

Egyetértek azzal a megjegyzéssel, amely szerint a munka egészének átlátása nem egyszerű feladat. Arra törekedtem, hogy munkámban bemutassam azokat a kutatásokat, amelyek egyes növények kémiai összetételének vizsgálatától egészen a klinikai hatásosság elemzéséig tartanak. A terjedelmi korlátok és a szerteágazó tematika miatt az elkészült anyag valóban nehezen olvasható. A megértést segítő rövidítésjegyzékkel kapcsolatos megjegyzés, miszerint nem mindegyik angol rövidítés mellett tüntettem fel a magyar kifejezést, jogos: néhány esetben, amikor az angol kifejezésnek nincs általánosan használt magyar változata, csak az angol szerepel a jegyzékben.

Egyetértek azzal is, hogy szerencsés lett volna a módszerek leírásánál feltüntetni azon közlemények hivatkozásait, amelyekben megtalálható a metodikák részletes leírása. Ez a szempont nem merült fel a disszertáció készítésekor, sajnálom, hogy ezáltal nehezítettem opponensem munkáját.

Egyetértek azzal, hogy az *Aconitum* fajokkal kapcsolatos vizsgálatok jelentős arányt képviselnek a disszertációban. Az ezzel kapcsolatos négy publikáció eredményei, az elsőként leírt új vegyületek fontos részét képezik munkámnak, azonban arra törekedtem, hogy a disszertációban átfogó képet nyújtsak az elmúlt években elvégzett kutatásaimról.

Az értekezéssel kapcsolatos kérdéseire, megjegyzéseire az alábbiakban válaszolok.

Kérdés: *Mivel magyarázható, hogy a közeli szerkezetek ellenére a fitoösztrogén-szerű hatásban nem elhanyagolható különbség észlelhető?*

Válasz: A *Cyclopia genistoides* vizsgálatával kapcsolatos kérdésre a következőkben válaszolok. A flavonoidok nagy szerkezeti változatosságot mutató vegyületek, a teljes vegyületcsoportra jellemző antioxidáns hatáson túl a csoport tagjai számos specifikus aktivitással is jellemezhetőek. Ezek közül az egyik az ösztrogénreceptoron kifejtett hatás. Az ösztrogénreceptorokhoz mutatott affinitás agonista vagy antagonistá hatásként egyaránt értelmezhető, mivel az ösztrogénszerű hatás mértéke jellemzően nagyságrendekkel kisebb, mint az endogén hormoné. 17-Béta-ösztradiol fiziológiás jelenlétében a

hatás így kompetitív antagonizmus, hormonhiányos közegben viszont gyenge agonista aktivitásként is értelmezhető. A fitoösztrogéneknek tekinthető flavonoidok hatásának jellege eltérő lehet, szerkezeti sokszínűségük miatt. A különbség nem csak az affinitás és a hormonszerű hatás mértékében, hanem a szelektivitásban is tetten érhető. Egyes vegyületek az alfa-, más anyagok a béta-ösztrogénreceptorokhoz mutatnak nagyobb affinitást. A fitoösztrogén flavonoidok szerkezet-hatás összefüggéseinek elemzésével több vizsgálat foglalkozott. *Choi és mtsai* egy átfogó vizsgálatban az ösztrogénszerű hatás mértékét valamint a szelektivitást is mérve határoztak meg szerkezet-hatás összefüggéseket [1]. Több mint 20 izoflavon, izoflaván, flavon, flavonol és kalcon vizsgálata arra utalt, hogy a vegyületek a daidzein és a biochanin A kivételével jelentős béta-ösztrogénreceptor-szelektivitásúak (a béta/alfa affinitási hányados 1,4 és 10,5 közötti). A vegyületek egy része egyáltalán nem mutatott ösztrogénreceptor-affinitást, az aktívnak bizonyuló vegyületek affinitása a 17-béta-ösztrodiol affinitásának 0,04-14,78%-a közötti volt. Már kis szerkezeti különbség nagy eltérést eredményezhet a hatásban: a flavonok közé tartozó krizin és apigenin mindössze egy hidroxilcsoportban különbözik, utóbbi béta-ösztrogénreceptor-affinitása egy nagyságrenddel kisebb IC_{50} értékkel jellemezhető, és csak ennél a vegyületnél mutattak ki kapcsolódást az alfa-ösztrogén-receptorhoz. Ugyanilyen megállapítás tehető a flavonol kempferol és kvercetinre is. A flavonoidok körében arányaiban az izoflavonok között található a legtöbb fitoösztrogén. A bioaktivitás kulcsai a 4' és 7 helyzetű hidroxilcsoportok, azonban az egyéb helyzetű szubsztituensek jelentősen befolyásolhatják a hatást: míg a genisztein ösztrogén-receptoraffinitása 10^{-8} - 10^{-7} M IC_{50} értékkel jellemezhető, a daidzeinnél ez az érték 10^{-6} M nagyságrendű, a 4',6,7-trihidroxiizoflavon pedig nem rendelkezik kimutatható alfa-ösztrogénreceptor-affinitással. Az 5-ös helyzetű hidroxilcsoportnak is szerepe lehet a fitoösztrogén-hatásban, amint az az apigenin és krizin, valamint 5-metoxiszármazékaik kapcsán kimutatható volt (utóbbiak receptoraffinitása jelentősen gyengébb) [1]. Valószínűleg ugyanez az oka annak is, hogy miért mértünk jelentősen gyengébb hatást a naringenin-5-glükozid esetén a naringeninhez képest.

Kérdés: Az izolációt és a vizsgálatokat mi célból végezte Jelölt fermentált és nem fermentált növényi anyagból is (a *Cyclopia genistoides* esetén)?

Válasz: A *C. genistoides* fermentált és nem fermentált mintáját is vizsgáltuk, ahogy erre Opponensem is rámutatott. Ennek oka, hogy mindkét termék forgalomban van, és mindkettőt széles körben fogyasztják élvezeti teaként. A nem fermentált terméket a begyűjtött és aprított levelek szárításával állítják elő. A fermentációt a szárítás előtt végzik. Az eljárás során hőközlés történik, amelynek következtében a polifenolos vegyületek oxidálódnak, és számos más, részleteiben még fel nem tárt folyamat is zajlik [2]. Ezek részben a fermentáció során a mintán szaporodó gombák metabolizmusának

eredményei, részben pedig a növényi mintában még aktív enzimek (pl. polifenol-oxidáz, peroxidáz) működésének termékei. De, amint arra egy vizsgálat rámutatott, az enzimatis folyamatoknál nagyobb jelentőségű a hőkezelés (amely fermentáció során spontán végbemegy), mivel a fermentált mézbokortea organoleptikus jellemzői akkor is kialakulnak, ha a feldolgozást az enzimek denaturálása után, hőkezeléssel végzik [3]. Bár a fermentált (hőkezelt) mézbokortea gazdagabb aromája miatt népszerűbb, a fermentálatlan („zöld”) tea is érdemes kémiai és farmakológiai vizsgálatokra, mivel átfogó jellemzéséhez még számos vizsgálati adat hiányzik. Ezért vállalkoztunk mi is mindkét típusú minta elemzésére, hogy azonos körülmények között elvégzett vizsgálatainkkal összehasonlítsuk ösztrogénszerű hatásaikat és feltárjuk az ezért felelős vegyületeket.

Kérdés: *Tekintettel arra, hogy (a Paraleucobryum longifoliumból kinyert fenantrének) színük alapján pigmenteknek tekinthetők, felvetődik a kérdés, vajon lehet-e a jövőben gyakorlati alkalmazásuk?*

Válasz: A speciális szerkezetű, 9,10-fenantrénkinon dimer leukobrineket elsőként írtuk le, az általunk kimutatott mérsékelt antiproliferatív hatáson kívül egyéb bioaktivitás-vizsgálati adat azóta sem áll rendelkezésre a vegyületekkel kapcsolatban. A 9,10-fenantrénkinon azonban közismert, citotoxikus hatású légköri szennyező anyag [4], ugyanakkor bizonyos származékoknak igazolt antibakteriális hatása van [5]. A 9,10-fenantrénkinonszármazékok farmakológiai profilja alig feltárt, dimerjeikről pedig még ennyit sem tudunk. Azt azonban kimutatták, hogy a dimerizáció a fenantrének daganatsejt-ellenes hatását fokozza [6], ezért célszerű lenne ezeket a vegyületeket más sejtvonalakon is vizsgálni. Azt is figyelembe véve, hogy 4 kg mohaminta feldolgozásával mg-os nagyságrendű mennyiségben nyertünk leukobrineket, ezeknek az anyagoknak az ipari hasznosítása jelenleg még nem tűnik perspektivikusnak, azonban baktérium- és daganatellenes hatásuk elemzése, kiegészítve toxikológiai vizsgálatokkal, ígéretes lehet. Pigmentként való felhasználásuknak korlátot szab a vegyületcsoportra jellemző citotoxicitás. A növényi forrásból való kinyerés nem tűnik gazdaságosnak, ha a vegyületek ipari hasznosítására kerül sor, más (szintetikus, félszintetikus) úton való előállítási módszerek kidolgozására lesz szükség.

Kérdés: *Lát-e perspektívát valamely (alkil-amid) vegyülettel kapcsolatban a vizsgálatok folytatásához, melynek eredménye esetleg a gyakorlatban is hasznosítható lehet?*

Válasz: A *Heliopsis helianthoides* és a *Lepidium meyenii* mintákból kinyert és azonosított alkil-amidok további vizsgálatának perspektivikusságával kapcsolatos kérdésre a válaszom a következő. Az alkil-

amidok között számos vegyület hat az endokannabinoid-rendszerre, ezért mi is ilyen irányban folytattunk kutatásokat. Az általunk vizsgált hat vegyület közül mindegyik mikromoláris koncentrációban gátolta a zsírsavamid-hidroláz (FAAH) enzimet. A vegyületek többsége (4/6) nagy affinitással kapcsolódott a CB-receptorokhoz, szelektivitást mutatva a CB₁ iránt. A vizsgált molekulák közül kiemelkedik a *N*-benzil-(9Z,12Z)-oktadekadienamid, amely nemcsak CB-receptor-szelektivitással, markáns FAAH-gátlással, hanem szubmikromoláris IC₅₀-értékkel jellemezhető anandamid-visszavételt gátló hatással is rendelkezik. Ezt a vegyületet korábban mások már leírták a *L. meyeri*ből [7]. A *Heliopsis helianthoides* var. *scabr*ából három új, 16, ill. 18 szénatomos, 3-6 kettős, illetve acetilénkötést tartalmazó zsírsavon alapuló izobutil- és metilbutilamidot nyertünk ki (oktadeka-2*E*,4*E*,8*E*,10*Z*,14*Z*-pentaén-12-insav-2'-metilbutilamid (**90**), hexadeka-2*E*,4*E*,9*Z*-trién-12,14-diinsav-izobutilamid (**91**), hexadeka-2*E*,4*E*,9,12-tetraénsav-2'-metilbutilamid (**92**). Ezek közül két vegyület (**91,92**) endokannabinoid-rendszerre kifejtett hatását tanulmányoztuk, s bár nem bizonyultak kiemelkedő aktivitásúnak, a molekulák kémiai újdonsága teszi perspektivikussá a további vizsgálatot.

A FAAH-gátló vegyületek a gyógyszerkutatásban fontos szerepet játszanak. Az endokannabinoid rendszer befolyásolásának egyik kívánatos módja ugyanis nem az exogén agonisták alkalmazása, hanem az endogén kannabinoidok szintjének növelése a központi idegrendszer bizonyos részein. Az endokannabinoid hatást közvetett módon fokozó vegyületek feltételezett előnye a közvetlen agonistákkal szemben a kedvezőbb mellékhatásprofil. Ha sikerül specifikus területeken aktivitást kifejtő, nem toxikus vegyületeket találni, ezek kutatása számos központi idegrendszeri betegség gyógyításában (depresszió, szorongás, neurodegeneratív kórképek) kezelésében hozhat áttörést [8]. Az ilyen irányú kutatásokban az általunk leírt vegyületek modellvegyületekként használhatóak. Az endogén kannabinoidok hatása az endokannabinoid-visszavétel gátlásával is fokozható [9]. Ilyen szempontból a *L. meyeri*ből leírt *N*-benzil-(9Z,12Z)-oktadekadienamid a leginkább perspektivikus, ugyanis ez szubmikromoláris koncentrációban, a referenciaként használt OMDM-2 és UCM707 vegyületeknél markánsabban gátolta az anandamid visszavételét.

Végezetül ismételen szeretném megköszönni Professzor Asszony részletes értékelését és észrevételeit. Tisztelettel kérem az opponensi bírálatra adott válaszaim elfogadását.

Szeged, 2021. november 3.

Tisztelettel:



Csupor Dezső

Irodalomjegyzék

- ¹ Choi S, Ha T, Ahn J, Kim S, Kang K, Hwang I, Kim S. Estrogenic Activities of Isoflavones and Flavones and their Structure-Activity Relationships. *Planta Med* 2008; 74: 25–32 Im Internet: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18095219/>
- ² McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity of south African herbal teas: rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia intermedia*). *Phyther Res* 2007; 21: 1–16 Im Internet: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16927447/>
- ³ Du Toit J, Joubert E. The Effect of Pretreatment on the Fermentation of Honeybush Tea (*Cyclopia maculata*). *J Sci Food Agric* 1998; 76: 537–545
- ⁴ Yang M, Ahmed H, Wu W, Jiang B, Jia Z. Cytotoxicity of Air Pollutant 9,10-Phenanthrenequinone: Role of Reactive Oxygen Species and Redox Signaling. *Biomed Res Int* 2018; 2018: 1–15 Im Internet: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29984252/>
- ⁵ Wersmeyer-Wenk B, Zähler H, Krone B, Zecek A. Metabolic products of microorganisms. 207 Haloquinone, a new antibiotic active against halobacteria. I. Isolation, characterization and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* 1981; 34: 1531–1537 Im Internet: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7333965/>
- ⁶ Kovács A, Vasas A, Hohmann J. Natural phenanthrenes and their biological activity. *Phytochemistry* 2008; 69: 1084–1110
- ⁷ McCollom MM, Villinski JR, McPhail KL, Craker LE, Gafner S. Analysis of macamides in samples of Maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV-MS/MS. *Phytochem Anal* 2005; 16: 463–469 Im Internet: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16315492/>
- ⁸ Tripathi RKP. A perspective review on fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors as potential therapeutic agents. *Eur J Med Chem* 2020; 188: 111953
- ⁹ Batista LA, Gobira PH, Viana TG, Aguiar DC, Moreira FA. Inhibition of endocannabinoid neuronal uptake and hydrolysis as strategies for developing anxiolytic drugs. *Behav Pharmacol* 2014; 25: 425–433 Im Internet: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25083569/>