

**Válasz Prof. Dr. Kálai Tamás egyetemi tanár, az MTA doktora,  
„A kémiai tér természetes anyagokon alapuló bővítése új bioaktív anyagok előállítására”  
című MTA doktori értekezésemre adott bírálatára**

Először is szeretném megköszönni Professzor Úrnak, hogy elvállalta értekezésem bírálatát, a befektetett munkát, elismerő szavait, és konstruktív észrevételeit.

Az általános formai észrevételeket köszönöm, és elfogadom. Az 1. ábra az értekezés egy korábbi verziójában a rendelkezésünkre álló kismolekulás gyógyszerkincs eredet szerinti felosztását mutatta be, ezt végül kivettem, a számozást azonban valamiért csak a (második) 3. ábrától kezdődően korrigáltam. A 16. ábrával kapcsolatban a kép sajnálatos felbontási problémájáról lehet szó; ezen az ábrán négyzet alakú jelölő nem szerepel, viszont két üres kör jelölőn az alsó-felső hibahatárt jelző vonalak a kör alsó és felső érintőjére esnek, így a rossz minőségű nyomtatás miatt jelenhettek meg ezek négyzetként. A 27. ábrán tudatosan igyekeztem az üzenetet az oxidatív dearomatizáció körülményeire fókuszálni. Egyetértek ugyanakkor, hogy valóban hasznos lett volna ugyanakkor a többi reakciólépést is részletezni, mivel később (29. B ábra) lényegében ugyanezt a reakcióutat követve állítottunk elő 6-szubsztituált protoflavon származékokat. Bár ez utóbbinál röviden jeleztem a reakciókörülményeket, saját munkánk erre vonatkozó újdonságtartalma így kevésbé egyértelmű. A szóhasználatra vonatkozó valamennyi megjegyzés jogos, ezeket elfogadom.

A spenót minta eredetével kapcsolatos észrevétellel is egyetértek. Valamelyest mentségemre szól, hogy a szóban forgó mintát eredetileg csak egy gyors összehasonlítás céljából kaptuk Szendrei Kálmán professzor úrtól, és a pontos tudományos információ nem állt rendelkezésre. Miután a jóval később elkészült, s a *Cyanotis* minták összetételére fókuszáló kéziratban elfogadták a „pozitív kontroll” spenótnak ezt az egyszerű leírását, erre később nem tértünk vissza.

Köszönöm Professzor Úrnak, hogy felhívta figyelmemet a **230**-as vegyületet tartalmazó korábbi publikációkra; az anyagot a SciFinder adatbázis alapján véltük tévesen újnak, a keresés során valószínűleg a cikkekben való R csoportos ábrázolás miatt nem jelent meg.

Professzor Úr részletes kérdéseire adott válaszaim az alábbiak.

- 1) A 24. oldalon lévő 1. Táblázatban feltüntette a VerdeFit készítményből izolált ekdiszteroidok m/m%-os mennyiségét 20E vegyületre kalibrálva. Ez belső, v. külső kalibráció volt? Figyelembe vették-e, hogy pl. a 20E ill. 8 vegyület különböző moláris extinkciós koefficienssel rendelkezhet adott hullámhosszon?

**Válasz:** Külső kalibrációt használtunk, egy 2,00 µg/ml koncentrációjú törzsoldatból négyszeres sorozathígítással (500, 125, 31,25, 7,81, 1,95 és 0,49 µg/ml) készített kalibráló oldatsorozat 10-10 µl térfogatait injektáltuk a kalibrációs egyenes felvételéhez. A **8** vegyület dienon szerkezete valóban eltérő moláris extinkciót, és magasabb (298 nm) UV elnyelési maximumot is eredményez, amelyet nem vettünk figyelembe. A mérésre használt hullámhosszon moláris extinkciója a referenciaként használt 20-hidroxiekdizonénak kb. szűk fele, ezért mennyiségét a mintákban vélhetőleg ilyen mértékben alábecsültük. Mivel azonban teljesen ismeretlen eredetű és feldolgozási technológiájú étrendkiegészítőkről van szó, a kvantitatív analitika tudatosan csak a nagyságrendek behatárolására irányult, és ilyen mértékű eltéréseket az üzenet szempontjából elfogadhatónak ítéltünk. Egyetértek ugyanakkor, hogy korrektebb lett volna erre az egy vegyületre vagy külön kalibrálni, vagy legalább a saját UV elnyelési maximumán integrált csúcsterületeket figyelembe venni a számításhoz; ez utóbbin

moláris extinkciója jóval közelebb van a 20E saját maximumán mutatott elnyelésének, így a becslés is jóval pontosabb lett volna.

2) A **21** vegyület lézer flash fotolízis közbeni keletkezésére tudna-e mechanizmust javasolni? (39. o.).

**Válasz:** A besugárzáshoz használ 266 nm hullámhossz, és az oldalláncnak a kromofórtól való távolsága miatt véleményem szerint ennek a vegyületnek a keletkezését csak intermolekuláris reakció magyarázhatja. A besugárzott enon kromofór kettős gyököt képez, ennek átrendeződései során a 14-es hidroxilcsoport hidroxilgyökként lehasadhat (ez vezet pl. a **33** és **38** anyag képződéséhez), ill. a hidroxilgyök az oldószer metanollal való, elsődleges termékként hidroximetil gyök keletkezik (Monod et al., 2000); ez utóbbi alakítja ki a **33** anyag 6-aldehid csoportját. Mindezen szabad gyökök párhuzamos jelenléte mellett tovább bonyolítja a képet, a rendszer molekuláris oxigént is tartalmazott, mivel a besugárzást légköri viszonyok között végeztük. Véleményem szerint emiatt többféle mechanizmus is lehetséges. A legvalószínűbb indító lépésnek a 22-OH csoportról végbemenő H-atom absztrakciót gondolom, majd ezt követően a 20,22-kötés homolitikus hasadása és további gyökös reakciók / átrendeződések után az oldallánc vélhetőleg aldehidként, a láncrövidült szteroid rész pedig a 20-ketocsoportot tartalmazó posztsteronként (**21**) stabilizálódhat.

3) A 44. oldalon számos multidrogo rezisztenciát csökkentő hatású vegyületet mutat be a szerző. Kérdésem, hogy az O-acetil vegyületek **41-47** mennyire stabilisak? Pl. nincs-e acetil vándorlás?

**Válasz:** A **41** és **43-47** anyagokat munkánk során stabilnak találtuk, s vizsgálataink időablakán belül a **42** anyag esetén sem tapasztaltunk változást. Ez utóbbi ugyanakkor oldatban vélhetőleg hasonlóan viselkedik a 20E 2- és 3-acetátjaihoz, amelyek esetén valóban tapasztaltunk a szakirodalomban is korábban leírt 2,3-O-acetil vándorlást (Horn, 1971). Az oldallánc diolján (20,22) ugyanakkor ilyen sosem tapasztaltunk, a 22-acetát semleges oldatban stabilnak mondható. Mivel az ekdiszteroidok már enyhén savas, vagy lúgos oldatban is hajlamosak változást szenvedni (s ez az acetátokra különösen is igaz lehet), ezért lehetőség szerint mindig pH semleges oldatban dolgoztunk velük. Azt is érdemesnek tartom megjegyezni, hogy az ekdiszteroid acetátok biológiai közegben vélhetőleg gyors enzimatisz hidrolízisen esnek át. Ennek következtében tumor rezisztencia csökkentőként alkalmazhatóságuk erősen korlátozott lehet, s inkább a nem acetilezett ekdiszteroidok citoprotektív hatású pro-drugjaiként jöhetnek számításba.

4) A **60-90** vegyületek előállítása során a dioxolán vegyületek képződése közben (17. ábra, 48. oldal) aszimmetrikus keton ill. aldehid alkalmazása esetén egy újabb sztereogén centrum (kiralitás centrum) képződik. Az így keletkezett diasztereomer párokat sikerült-e szétválasztani és biológiai vizsgálat(ok)ban tesztelni?

**Válasz:** Három ilyen párt sikerült előállítanunk: a **68-69** és **70-71** (29-epimerek), valamint a **83-84** (28-epimerek), és a diasztereomer párok hatása jelentősen eltért. Ezen párok és a **74-78** anyagok rezisztenciacsökkentő hatásának összehasonlítása alapján a C-28 (2,3-diolon képzett dioxolán) esetén a nagyobb szubsztituens alfa, a C-29 (20,22-diolon képzett dioxolán) esetén pedig béta helyzete preferált. Ez a szerkezet-hatás összefüggés ugyanakkor nem volt igaz a Pgp gátló hatásra. Ez különösen a **83** és **84** anyag esetén volt szembevetendő: a **83** anyag viszonylag erős Pgp gátló (IC<sub>50</sub> 2 µM alatt) és gyenge rezisztenciacsökkentő (doxorubicinnel együttes kezelés súlyozott kombinációs indexe 0,71), a

84 anyag viszont Pgp gátlás szempontjából 2  $\mu\text{M}$  koncentrációban inaktív, és 28-epimerjétől jóval erősebb rezisztenciacsökkentő ( $\text{CI}_{\text{avg}}=0,38$ ) hatású volt.

5) A 110-117 O-alkil oximok előállításával mellett próbálkoztak-e N,N-dialkilhidrazonok előállításával?

**Válasz:** Ilyen anyagok előállításával eddig nem próbálkoztunk, de ezek valóban érdekes célvegyületek lehetnének. Néhány hasonló kezdeményezésünk volt, pl. láncrövidült posztsteronból előállítottuk a 20-dinitrofenil-hidrazon származékot, de ezt a kutatási irányt végül nem folytattuk. A B-gyűrűn módosított, nem citotoxikus protoflavon származékok vizsgálata kapcsán állítottunk elő a közelmúltban új szemikarbazon és tioszemikarbazon származékokat, amelyek antibakteriális hatását jelenleg is vizsgáljuk.

6) A 72. oldalon bemutatott protoflavonok redukciójukor nem tapasztalták-e a flavon C-gyűrűjének a redukcióját is?

**Válasz:** Nem tapasztaltunk ilyen mellékreakciót. A folyamatos áramú hidrogénezés módszerkidolgozásának részleteit az SR12 (Ötvös *et al.*, 2018) közleményünkben publikáltuk. A módszerkidolgozás során a B-gyűrűn csak részben telített dihidroprotoflavon származékok mellett egy nemkívánt melléktermékünk volt a redukció során, a B-gyűrű újra aromizálódásával keletkező apigenin. Ez vélhetőleg az oxocsoport redukciójával, majd az 1'-szubsztituens ezt követő leszakadásával mehetett végbe. Ez a melléktermék valamelyest nagyobb mennyiségben keletkezett a protoapigenon, mint az 1'-O-alkil származékok reakciója esetében, de mennyisége rendszerint nem haladta meg a kb. 20%-ot.

7) A Szerző értekezésének 73-74 oldalain a protoflavonok HIV-1 és EBV ellenes hatásáról ír. Van-e arról információja, hogy mi ezen vegyületek hatásmechanizmusa (reverz-transzkriptáz inhibitor, entry inhibitor, proteáz inhibitor stb.)?

**Válasz:** Az EBV ellenes hatás kapcsán van tudomásunk hatásmechanizmusról. A protoapigenonról korábban leírtuk, hogy az EBV aktív vírusprodukciónal járó úgynevezett lítikus ciklusát gátolja: a Zta (EB1) fehérje transzaktivációs funkciójának gátlásán keresztül jóval a citotoxikus koncentráció alatt gátolja az Rta, Zta, EA-D és VCA lítikus fehérjék expresszióját P3HR1 gazdasejtekben (SR17; Tung *et al.*, 2011). Az értekezés alapjául szolgáló, újonnan előállított anyagok vizsgálata során (S19; Vágvölgyi *et al.*, 2019) már csak az Rta expressziójára kifejtett hatást vizsgáltuk, ez alapján a 135, 136 és 138 anyagok hatása vélhetőleg a protoapigenonhoz hasonló mechanizmuson keresztül valósul meg.

A HIV-ellenes hatás kapcsán csak annyi információnk van, hogy az általunk használt egy replikációs ciklust mérő pszeudotípus vírus teszt leginkább a HIV replikáció korai lépéseinek gátlását képes kimutatni. Eredményeink alapján az valószínűsíthető, hogy a 221 anyag reverz transzkriptáz, vagy integráz gátló lehet, a gyenge hatás miatt ugyanakkor nem végeztünk további vizsgálatokat.

8) A 38. ábrán (86. o.) bemutatott, peroxinitrittel végzett bioreleváns oxidációkor nem tapasztaltak-e aromás C-nitroso vegyület képződést is?

**Válasz:** Bár ilyen vegyületek képződését nem tapasztaltuk, a felvetés rendkívül érdekes. Fenollal, mint modellvegyülettel nyert eredmények (Uppu *et al.*, 1998) alapján a peroxinitrit aromás C-nitroso vegyületeket a reakcióelegy lúgosságától és a benne oldott széndioxid mennyiségétől függően képes kialakítani. Előbbi a fenolát ion, mint aktív reakciópartner, utóbbi a peroxinitrit és a széndioxid

reakciójából keletkező reaktív köztitermékek képződése miatt fontos. Mivel a széndioxid vízben való oldékonysága a hőmérséklet csökkenésével nő, mi pedig jégfürdőben dolgoztunk lúgos pH-n olyan vizes oldatokkal, amelyek egyike sem volt előtte légtelenítve, valamilyen mértékű nitrozálás esetünkben is végbemehetett. Mindenképpen érdemes lenne ezt tovább vizsgálni. Fontos ugyanakkor, hogy vélhetőleg biológiai közegben is képződő aromás nitrozo metabolitokat csak olyan antioxidánsokból nyerhetünk, amelyek rendelkeznek fiziológiás pH-n is döntően disszociált fenolos hidroxil csoporttal. Ilyen a flavonok 7-es hidroxil csoportja (pl. apigenin:  $pK_a=6,9$ ; Favaro *et al.*, 2007).

9) A **232** és **233** vegyületeknek (88. o) csak a *transz* formái képződtek? Minor komponensként nem jelentek meg a *cisz* formák?

**Válasz:** Az előzetes LC-MS szűrővizsgálatok során több olyan minor terméket is detektáltunk, amelyek m/z értékeik alapján vélhetően hidroxifahéjsav dimerek voltak. Bár a fahéjsav oldallánc olefinjének konfigurációja miatt a *transz* forma messze preferáltnak tűnik, pl. a *transz*-rezveratrol oxidációja kapcsán végzett vizsgálataink során időközben főtermékként is állítottunk már elő *cisz*-szubsztituált dihidrofurán gyűrűt tartalmazó, a **232** vegyület *cisz* izomerjével analóg dimert (*cisz*-delta-viniferint). Valószínűnek tartom tehát, hogy jelen voltak a Professzor Úr által említett *cisz* formák is.

Végezetül szeretném még egyszer megköszönni Professzor Úrnak értekezésem alapos bírálatára fordított munkáját és gondolatébresztő, konstruktív észrevételeit. Tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Hunyadi Attila

Szeged, 2022. 06. 02.

*A válaszban hivatkozott források listája:*

Favaro, G. *et al.* (2007) Acidichromism and Ionochromism of Luteolin and Apigenin, the Main Components of the Naturally Occurring Yellow Weld: A Spectrophotometric and Fluorimetric Study. *J Fluoresc*, 17, 707–714.

Horn, D.H.S. (1971) The Ecdysones. In: Naturally Occurring Insecticides; Jacobson, M., Crosby, D.G., Eds.; Marcell Dekker, Inc.: New York, NY, USA; pp. 333–459.

Monod, A. *et al.* (2000) Oxidation of methanol by hydroxyl radicals in aqueous solution under simulated cloud droplet conditions, *Atmos Environ*, 34, 29–30.

Ötvös, S.B. *et al.* (2018) Synthesis of Nontoxic Protoflavone Derivatives through Selective Continuous-Flow Hydrogenation of the Flavonoid B-Ring. *ChemPlusChem*, 83, 72-76.

Tung, C.P. *et al.* (2011) Inhibition of the Epstein-Barr virus lytic cycle by protoapigenone. *J Gen Virol*, 92, 1760-1768.

Uppu, R.M. *et al.* (1998) Nitrosation by Peroxynitrite: Use of Phenol as a Probe. *Arch Biochem Biophys*, 358, 1-16.

Vágvölgyi, M. *et al.* (2019) Less Cytotoxic Protoflavones as Antiviral Agents: Protoapigenone 1'-O-isopropyl ether Shows Improved Selectivity Against the Epstein–Barr Virus Lytic Cycle. *Int J Mol Sci*, 20, 6269.