

**Válasz Prof. Dr. Takácsné Novák Krisztina 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 Asszonynak, hogy elvállalta értekezésem bírálatát, a befektetett munkát, elismerő szavait, és konstruktív észrevételeit.

Az általános formai észrevételeket köszönöm, és elfogadom. Professzor Asszony részletes észrevételeire az alábbi válaszokat adom.

1. A dolgozat címét túl általánosnak tartom. Ez a cím minden természetes alapú szintetikus munkára érvényes lehet. Helyesebb lett volna utalni a három konkrét vizsgált vegyületcsoportra.

**Válasz:** Egyetértek Professzor Asszony észrevételével. Igyekeztem a három, egyébként jól elkülönülő, leginkább szemléletében összetartozó témakört egy szabatosan összefoglaló címbe sűríteni, de ez végül valóban túl általánosra sikerült. Egyetértek azzal, hogy az „új bioaktív anyagok” helyett az anyagcsoportok konkretizálása lehetett volna a megoldás, így „A kémiai tér természetes anyagokon alapuló bővítése új, bioaktív ekdiszteroidok, protoflavonok, és antioxidáns metabolitok előállítására” helyesebb lett volna.

2. VF termékek analízise egy tételből történt, holott az összetétel étrend-kiegészítőkről lévén szó, tételről, tételre változhat. Végeztek-e azóta, vagy tervezik-e további tételek vizsgálatát összehasonlítás céljából, és az összetevők natív jellegének igazolását?

**Válasz:** Az 1. Tézisben bemutatott munka során bemutatott jelenség kapcsán felmerült bennünk, hogy esetleg érdemes lenne ezt kiterjedtebben is vizsgálni, de munkánk további termékanalitika felé fordítását végül elvetettük. Ez leginkább az ezzel kapcsolatos publikációs nehézségek miatt volt így; a tézis alapjául szolgáló egyik közlemény (S2; Hunyadi *et al.*, 2016) pl. a formális elfogadást követően hónapokig várta a megjelenést a helyettes főszerkesztő jogi aggályai miatt. Erőforrásainkat ezért inkább a nagy tételben beszerzett *Cyanotis* kivonatok minor ekdiszteroidjainak izolálására és vizsgálatára fordítottuk, és az értekezésben leírtakon túl 20 felett van az előállított, sok esetben nagyon különleges szerkezetű anyagok száma; ezek egy részét azóta publikáltuk (Tóth *et al.*, 2021). Az anyagok natív jellegének vizsgálata egy fontos célunk, ami sajnos egyelőre nem valósulhatott meg. Autentikus *C. arachnoidea* nyersanyagot egy shanghaji kutató kollégától, tajvani gyógynövény piacokon, ill az SZTE Fűvészkert segítségével magcsere programon keresztül próbáltunk beszerezni. Egyik sem volt sikeres, magcserevel ugyanakkor hozzájutottunk két egyéb *Cyanotis* fajhoz (*C. somaliensis* és *C. cristata*). Ezek is ekdiszteroid tartalmúak, de összetételük jelentősen eltér a vizsgált kivonatokétól.

3. A 3. ábrán az RP-HPLC kromatogramon a komponensek fordítva vannak feltüntetve. **13** a polárosabb vegyület, annak kell elsőként megjelennie a kromatogramon.

**Válasz:** Köszönöm az észrevételt, az ábrán valóban felcseréltem a két anyagot. Ez az értekezés sajnálatos szerkesztési hibája; a vonatkozó cikkben a megfelelő ábra helyesen szerepel, és a 4. Ábrán is a valós elúciós sorrendben szerepel ez a két anyag.

4. A **13** és **20** dezmotrópok esetén tapasztalt eltérő bioaktivitás a protein kináz B (Akt) foszforilációjára, véleményem szerint inkább tulajdonítható a célpontra való kötődésbeli különbségnek, mint sejtbejutásnak, tehát a farmakokinetikának, hiszen a két anyag polaritásában, ionizációs képességében nincs különbség. Ennek kapcsán kérdésem, hogy a kémiai tér bővítésénél milyen vezérelv érvényesült? Lipofilitás növelése, sav-bázis kémiai tulajdonság megváltoztatása szempont volt-e?

**Válasz:** Egyetértek a dezmotrópok hatásával kapcsolatos felvetéssel, az óvatos megfogalmazással a túlzó, a rendelkezésre álló kísérletes adatok által nem kellőképpen alátámasztott konklúziók elkerülése volt a célt. Fontos azt is kiemelni, hogy az alkalmazott vizsgálat csak egy, viszonylag magas koncentrációban történt. Az eltérő viselkedés jelentőségét az ekdiszteroidok Akt foszforilációra kifejtett hatásának harang-görbe szerű koncentrációfüggése (pl. 11. Ábra) nagymértékben árnyalhatja.

A kémiai tér bővítése kapcsán munkánk során nem volt olyan kémiai vezérelv, amit valamennyi vizsgált anyagcsoportra nézve általános érvényűnek mondhatnánk. Igyekeztünk az adott anyagcsoport jellegzetességeit figyelembe véve keresni olyan átalakításokat, amellyel jelentősen és hatásorientáltan növelhetjük a kémiai változatosságot. Az ekdiszteroidok és a protoflavonok kapcsán az antitumor farmakológiai eredmények alapján a lipofilitás növelése valóban fontos szemponttá vált. A sav-bázis tulajdonságok megváltoztatása egyik anyagcsoport esetében sem volt célunk. A műszerigényes átalakítások esetében az elérhető technika kémiai jellegzetességei inspirálták a munkát és határolták körül az elérhető kémiai teret; a lézer flash fotolízis mellett a közelmúltban pl. gamma radiolízist is sikeresen alkalmaztunk különleges szerkezetű, bioaktív ekdiszteroid származékot előállítására (Issaadi *et al.*, 2021). Az antioxidáns metabolitok előállításánál pedig az alapkoncepció adta a vezérelvet: olyan anyagok előállítását céloztuk, amelyek szabad gyökökkel való kémiai reakciók során akár az élő szervezetben is keletkezhetnek.

5. Az önrendeződő, szkvalén-ekdiszteroid nanorészecskék előállítását és vizsgálatát, nagyon érdekesnek és előremutatónak tartom. A savrezisztens apoláris szubsztitúció lehetőségét említi a 2,3-acetonid helyett. Milyen helyettesítések jöhetnek szóba?

**Válasz:** Köszönöm a pozitív észrevételt. A 2,3-acetonid más apoláris funkcióval való helyettesítésére több próbálkozásunk is volt. Egyrészt megvizsgáltuk a diol eltávolításának lehetőségét. Ehhez teszteltünk egy orosz együttműködő partnerünk által előállított, a 2,3-pozícióban diol helyett olefint tartalmazó posztsteron származékot, s antitumor hatását az acetamidénál jóval gyengébbnek találtuk (Savchenko *et al.*, 2021).

Az elmúlt évben megkíséreltünk továbbá dialkilezéssel gyűrűs éterképzést végezni a posztsteron A gyűrűjén, s 1,2-dibrómetán, 1,3-dibrópropán, ill. 1,2-dimetoxietán alkalmazásával 1,4-dioxán, vagy 1,4-dioxepán funkciót kiépíteni. Nem értünk el sikert, egyes reakciókörülmények túl enyhék, mások pedig a szubsztrát érzékenységéhez mérten túl erőteljesek voltak.

Egy harmadik próbálkozásunk során pedig a *C. arachnoidea*-ból izolált kaloniszteron 2-acetát részleges védettségét igyekeztünk kihasználni és DAST alkalmazásával fluorra cserélni a 3-OH csoportot, ez azonban vízelimináción keresztül egy érdekes, új ciklopropán gyűrűzárt terméket eredményezett (Vágvölgyi *et al.*, 2022). Bár ez az anyag hatásos volt, a gyenge termelés miatt a publikációt követően nem foglalkoztunk vele tovább.

A 2,3-acetonid csoportot ugyanakkor jelenleg arra igyekszünk felhasználni, hogy szkvalénal funkcionizált citoprotektív anyagok kettős pro-drugjait állítsuk elő, amelyek egyrészt az önrendeződést indukáló észter funkciót, másrészt az endocitózist követően elbomló savérzékeny 2,3-acetonidot tartalmazzák. Ezzel igyekszünk utánajárni a 3. Tézis végén felvetett gondolatok farmakológiai hasznosíthatóságának.

6. Mit jelent a protoflavonok hatásmechanizmusa kapcsán említett ataxia teleangiectázia?

**Válasz:** A protoflavonok hatásmechanizmusában részt vevő, ún. ataxia teleangiectázia és RAD3 (ATR) fehérje egy szerin/treonin kináz enzim, amely az egyszálú DNS törésre adott válasz egy esszenciális résztvevője, és egy jelenleg ígéretesnek tűnő, tumorszelektív terápiás célpont. Maga az ataxia-teleangiectázia egy az immunrendszert és az idegrendszert megtámadó örökletes betegség, amely az ATM fehérjét kódoló gén mutációja miatt alakul ki; az ATM a kétszálú DNS törésre adott válasz résztvevője.

7. A 31. ábrán a protoflavonoidok A gyűrűjére vonatkozó szerkezet-hatás összefüggéseket mutatja be. Számomra nem derül ki, milyen csoportokra vonatkoznak az a-d jelzések?

**Válasz:** Az ábrán az egyes box-plotok az azonos A gyűrűt, de eltérő 1' szubsztituenszt tartalmazó származékok MDR szelektivitását tartalmazzák, és a statisztikai analízis során páronként mindegyik ilyen anyagcsoport adathalmazát összehasonlítottuk. A statisztikailag szignifikáns különbséget mutató anyagcsoportok kisbetűs jelzésében nincs átfedés, tehát pl. a 6-metoxiprotoflavonok MDR szelektivitása (ac) szignifikánsan alacsonyabb, mint a 6-metil- (bd), vagy 6-fenilprotoflavonoké (d), de nem tér el szignifikánsan az 5-hidroxi-7-metoxiprotoflavonok (ab) szelektivitásától.

8. A 79. oldalon három pontba szedve indokolja, hogy az 5. tézisének alkalmazott koncepció miért jelölhet ki különösen érdekes kémiai területet a gyógyszerkutatás számára. A harmadik pont, elég homályos megfogalmazását kifejtené konkrétan?

**Válasz:** A ROS/RNS befogás során keletkező lehetséges termékek kémiai változatosságát tekintve minden kismolekulás antioxidáns felfogható egy viszonylag kiterjedt metabolit-tér kiindulópontjaként. Ugyanakkor egy adott biológiai környezetben az összes lehetséges származéknak csak egy része fog ténylegesen is megjelenni, s ezen termékeket (ill. azok egymáshoz való arányát) az antioxidánsokkal reagáló ROS/RNS minőségi és mennyiségi viszonyai fogják meghatározni. Ezért úgy vélem, kijelenthető, hogy egy antioxidánsból oxidatív stressz alatt álló biológiai környezetben ténylegesen képződő oxidált termékprofil olyan kémiai információt hordoz, amely végső soron az adott mikro-környezet oxidatív stressz viszonyait fejezi ki. Ha pedig ez igaz, akkor logikus hipotézis lehet az, hogy különösen az étrendi antioxidánsokból képződő termékprofilok az oxidatív stressz-szel összefüggő jelátviteli folyamatok szerves részeként is működhetnek. Ez alapján az ilyen antioxidánsok diverzitás-orientált biomimetikus oxidatív átalakításai jó eséllyel mind a kémiai, mind a biológiai teljesítmény diverzitás növelésének is egy releváns lehetőségét kínálja.

9. Végül, minden tézispont befejezésénél a továbbfejlesztés többirányú lehetőségét vetíti fel. Összességében mit tart a legígéretesebb molekulának, amire, mint „lead-re” egy kutatási programot leginkább érdemes lenne indítani?

**Válasz:** Összességében jelenleg legígéretesebbnek a 20-hidroxiiekdizon egyik oxidált származékát, a kaloniszteront (13) tartom. Ezt a dolgozatban leírt eredményeken túl egy rendkívül hatásos vér-agy gát protektív anyagként azonosítottunk: már 10 nM koncentrációban képes megvédeni agyi endotél sejteket az oxidatív stressz okozta károsodástól, ezáltal változatos neurodegeneratív kórképek megelőzésében / terápiájában lehet hasznos. Egy erre az anyagra alapozott kutatási programot el is indítottunk, amelynek keretében számos vizsgálat van jelenleg is folyamatban:

- i) proteomikai megközelítéssel vizsgáljuk az anyag hatásmechanizmusát (együtműködés az SZBK-ban, az SZTE-n, és a Harvard-on),
- ii) egy KDP ösztöndíjas PhD hallgatóm dolgozik gazdaságos előállításához ipari léptékű folyadék-folyadék kromatográfias módszerfejlesztésen (együtműködés a RotaChrom Technológiai Zrt-vel) és rokon származékok félszintézisén,
- iii) egy a SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézetben társtémavezetésemmel dolgozó PhD hallgató vizsgálja diabéteszes patkányokon kifejtett protektív hatását, és
- iv) egy tajvani együtműködő kutatócsoport vizsgálja tüdő epitél sejteken kifejtett protektív hatását.

A kaloniszteron és származékai citoprotektív hatásának vizsgálata egy 2020 októberében indult NKFI-K projekt egyik fontos eleme.

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



Hunyadi Attila

Szeged, 2022. 06. 01.

*A válaszban hivatkozott források listája:*

Hunyadi, A. *et al.* (2016) Ecdysteroid containing food supplements from *Cyanotis arachnoidea* on the European market: evidence for spinach product counterfeiting. *Sci Rep*, 6: 37322.

Issaadi, H.M. *et al.* (2021) Diversity-oriented synthesis through gamma radiolysis: Preparation of unusual ecdysteroid derivatives activating Akt and AMPK in skeletal muscle cells, *Bioorg Chem*, 112, 104951.

Savchenko, R.G. *et al.* (2021) *In vitro* adjuvant antitumor activity of various classes of semi-synthetic poststerone derivatives, *Bioorg Chem*, 106, 104485.

Tóth, G. *et al.* (2021) A Commercial Extract of *Cyanotis arachnoidea* Roots as a Source of Unusual Ecdysteroid Derivatives with Insect Hormone Receptor Binding Activity. *J Nat Prod*, 84, 1870-1881.

Vágvölgyi, M. *et al.* (2022) Diversity-Oriented Synthesis Catalyzed by Diethylaminosulfur-Trifluoride—Preparation of New Antitumor Ecdysteroid Derivatives. *Int J Mol Sci* 23, 3447.