

Válaszok Dr. Csupor Dezsőnek az MTA doktori értekezésemre adott bírálatára

Szeretném megköszönni Dr. Csupor Dezső részletes és alapos bírálatát, a sok jobbító megjegyzést, valamint a dolgozat támogatását. A bírálat végén található 9 kérdésen kívül is vannak megjegyzések, amelyekre röviden reflektálok a válaszomban.

A bírálat szövegében bírálóm több formai kritikát is megfogalmazott, ezekre az alábbiakban reagálnék:

A célkitűzések megfogalmazása valóban csak egy rövid bekezdés, de ennél többet így utólag sem tudnék írni, tekintetbe véve a témák sokféleségét, amivel kapcsolatba kerültem.

Az irodalmi bevezető egyes részeinek rövidségét is kifogásolta a bíráló: az izolálásról azért nem írtam az általános módszeren kívül, mert gyakorlatilag mindig hasonló módon történik és idéztem saját összefoglaló cikkeket. A karotinoidok szerkezetével, illetve az analitikai módszerekkel kapcsolatban úgy gondoltam, nem kell belemennem a részletekbe egy ilyen dolgozatban. A bioszintézist illetően viszont valóban jó lett volna egy folyamatábra és leírás a saját vizsgálatokhoz is kapcsolódva.

Az egyes módszerek részletes bemutatását azért mellőztem, mert úgy gondoltam, ezek a cikkekben megtalálhatóak, illetve korábbi MTA doktori dolgozatokat is megnéztem iránymutatásul.

A sejtvonalakon végzett antioxidáns vizsgálatokkal kapcsolatosan még nem jelent meg cikk, ezért adtam meg csak az érdekesebb eredményeket.

A saját vizsgálatoknál megadtam a fontosabb karotinoidok teljes képletét és az irodalmi részben is a reakciók teljes képlettel szerepelnek, de másik bíráló is hiányolta, hogy a részletesebb képletek több helyen is legyenek feltüntetve. Terveztem egy képleteket tartalmazó függeléket a dolgozathoz, de végül lebeszéltek róla.

Köszönöm, hogy további stilisztikai hibákra és elírásokra is felhívta a figyelmemet, de az „egyes esetekben még a távoli UV finomszerkezetét is lehet szerkezetmeghatározásra használni” kijelentés nem tévedés, hanem egy érdekes felfedezés (*Journal of Food Composition and Analysis* **2018**, 67, 159–162, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.037>).

A feltett kérdésekre az alábbiakban válaszolok:

1. A dolgozat 25-27. oldalán a bioszintézissel kapcsolatos hipotézist mennyiben támasztják alá szakirodalmi, enzimológiai vagy molekuláris biológiai bizonyítékok?

Dezoxi- κ végcsoportot tartalmazó karotinoidot korábban csupán egyszer mutattak ki pirospaprikából, de ott minor komponensként, szinte csak nyomokban fordul elő. Emiatt nem léteznek olyan enzimológiai/biológiai vizsgálatok, amelyek a hipotézisünket alátámasztanák. A megadott enzimaktivitások (epoxidálódás, átrendeződés) viszont 3-hidroxi végcsoportokra

jól ismertek más növényből. Itt a fő bizonyíték az lehetne, ha a (parikából izolált) kapszantin-kapszorubin szintáz (CCS) a hidroxilálatlan epoxidokat is átalakítaná a kappa-gyűrűvé. Így valószínűsíthetnénk, hogy *in vivo* is megy ez az átalakulás és a CCS nem specifikus a hidroxiepoxidokra. Sajnos egyelőre nem találtunk olyan kooperáló partnert, akinek van ilyen enzime és hajlandó lenne elvégezni a kísérleteket.

2. Milyen specifikus kromatográfiás és preparatív előnyökkel rendelkezik a módosított „Szilika-9” gél az 5,6-epoxi-karotinoidok elválasztása során a hagyományosan alkalmazott, szintén bázikus kémhatású alumínium-oxidhoz képest?

Mind a két adszorbens használható, de a szilikagél kapacitása nagyobb, valamint mivel ezt használjuk általánosan nagy mennyiségben, relatíve olcsóbb is. Egyes speciális esetekben mi is használtunk már alumínium-oxidot, de a kereskedelmi forgalomban kapható, elvileg ugyanolyan specifikációjú adszorbensek is elég különbözően viselkedtek. A szilika-9-et viszont jól reprodukálhatóan és egyszerűen el tudjuk készíteni bármikor.

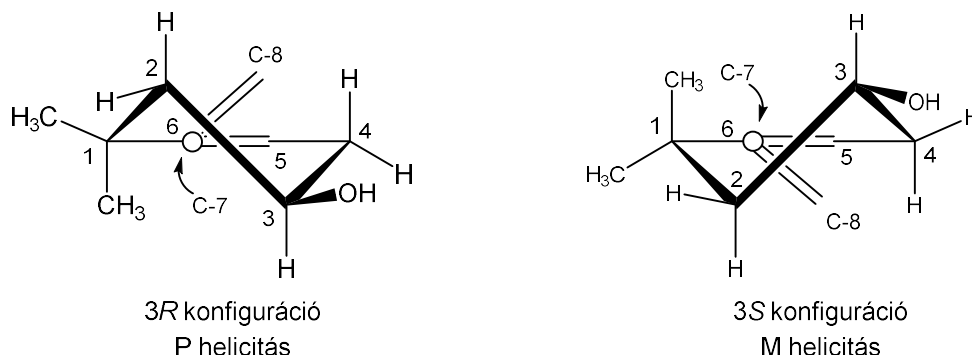
3. A 39. oldalon a szerző megállapítja, hogy a lutein szükséges a megfelelő agyműködéshez. Ezzel kapcsolatban milyen szintű biokémiai vagy klinikai bizonyítékok állnak rendelkezésre?

Mivel a lutein gyakorlatilag mindenféle étrendben előfordul valamilyen mennyiségben, teljes luteinhiánnyal járó állapotokat nem ismerünk. Klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy a lutein dúsul az agyban, és magasabb koncentrációja jobb kognitív funkciókkal jár együtt, illetve illetve idősebb korban késlelteti a szellemi hanyatlást (*Cur. Develop. Nutr.* **2019**, 3(7): nzz066. doi: 10.1093/cdn/nzz066; *Phytomedicine* **2024**, 135, 156185). Magzati és csecsemőkorban különösen magas az agyban található luteinkötő fehérje (StARD3) koncentrációja, ami arra utal, hogy a lutein szükséges lehet az idegrendszer fejlődésében (*PloS One* **2016**, 11(5): e0155488.). Saját *in vitro* vizsgálatainkban a lutein neuroprotektív hatásának bizonyult.

4. Mennyire tekinthető az ECD-spektrum önmagában szerkezetbizonyító, az elkülönítést lehetővé tévő módszernek a kriptoxantin sztereoisomerek esetén, tekintettel arra, hogy azok nagyméretű, flexibilis, hosszú konjugált rendszerű molekulák? Milyen esetekben lehet szükséges az ECD-eredményeket más független módszerrel megerősíteni?

Bár a karotinoidok elvileg flexibilis molekulák, a polién-láncban és a végcsoportokon található metilcsoportok szterikus hatása miatt általában egy kitüntetett konformációt vesznek fel, amelyben a β -végcsoportokban található kettős kötés és a polién lánc nem kooplanáris. Amennyiben a végcsoportokon egyéb szubsztituens is található, a kromofór szerkezete önmagában királissá válik (helikális kiralitás) és jellegzetes ECD jelet ad, mivel a legalacsonyabb energiájú elektronátmenet ($S_0 \rightarrow S_2$) exciton-csatolt rendszerként viselkedik.

Az ECD spektrumot elsősorban a gyűrűkonformáció határozza meg, azonban a β -végcsoporton található szubsztituensek abszolút konfigurációja hatással van a gyűrűkonformációjára, így befolyásolja a molekula geometriáját, azaz a helicitás irányát.



A 3-hidroxi- β -gyűrű konformációi a C-6/C-7 kötés tengelye mentén szemlélve 3R és 3S konfigurációk esetén.

Az ECD spektrumban általában egymás mellett jelenik meg egy pozitív és egy negatív Cotton-effektus, ezek sorrendje korrelál a helicitással (P vagy M) (Mill-féle empirikus korreláció). A legtöbb aszimmetrikusan szubsztituált β -végcsoporttal rendelkező karotinoid ún. konzervatív ECD spektrumokat ad, jellegzetes mintázattal (*Acta Chem. Scand.* **1972**, 26, 3053-3067).

Első ránézésre nem nyilvánvaló, hogy a β -végcsoport 5,6-kettős kötésének epoxidra történő cseréje továbbra is egy önmagában királis kromofórt eredményez. Ennek ellenére a karotinoid 5,6-epoxidok erősen konzervatív ECD spektrumot szolgáltatnak, amelyek teljes mértékben összevethetők a megfelelő β -végcsoportokéval. Mivel az epoxidcsoport önmagában sztereogén, az erős ECD jel kialakulásához nem szükséges a végcsoporton további aszimmetriacentumok jelenléte. Ha ilyen mégis megtalálható, mint pl. a kriptoxantin-epoxidok esetében, az csak igen kis mértékben befolyásolja az ECD jelet. Emiatt az epoxidok ECD spektrumából elsősorban az epoxidgyűrű konfigurációjára következtethetünk.

Önmagában tehát az ECD-spektrum nem alkalmas szerkezetbizonyításra, de ismert konfiguráció epoxidéval összehasonlítva a spektrumot két izomer közül nagy valószínűséggel ki tudjuk választani a jelenlévőt. Több esetben a *szün*- és *anti*-epoxidok ^1H -NMR-ben is jellegzetes, szignifikáns különbségeket mutatnak a kémiai eltolódásokban. Végleges és biztos választ természetesen csak a röntgenkristallográfia tudna adni.

5. A *Zamia* kivonatok elemzésénél a piros és a sárga karotinoidok kvantifikálása milyen módszerrel történt?

A teljes karotinoidmennyiség meghatározásához általában a 450 nm-en felvett spektrumot használják, a β -karotin moláris abszorpciós koefficiensével számolva. Ez a módszer azonban alulbecsüli a piros karotinoidok mennyiségét. A Harvey által javasolt elv (Harvey, D. In *Modern Analytical Chemistry*, 1st ed.; McGraw Hill: Boston, **2000**, pp. 388–412) alkalmazásával kidolgoztunk egy módszert a piros és sárga karotinoidok egyidejű meghatározására. Ehhez meghatároztuk a (sárga) lutein és a (piros) kapszorubin A1% értékeit, mindkettőét 445 és 510 nm hullámhosszon is. (Az A1% egy adott hullámhosszon mért, 1 g/100 ml koncentrációjú oldat abszorbanciája.)

A lutein és a kapszorubin A1%-értékei 445 és 510 nm-en etanolban:

Karotinoid	A1% (445 nm)	A1% (510 nm)
Lutein	2550.0	82.6
Kapszorubin	1353.3	2013.6

Ezután felvettük az elszappanosított extraktumok UV-vis spektrumait 445 és 510 nm hullámhosszon (A_{445} és A_{510}), amelyekre az alábbi összefüggések írhatók fel:

$$A_{445} = 1353.3 c_{\text{kapszantin}} + 2550 c_{\text{lutein}}$$

$$A_{510} = 2013.6 c_{\text{kapszantin}} + 82.6 c_{\text{lutein}}$$

ahol $c_{\text{kapszantin}}$ a piros karotinoidok koncentrációja, c_{lutein} pedig a sárgáké. A két egyenletből

$$c_{\text{lutein}} = \frac{1.49 A_{445} - A_{510}}{3716.9} \quad (\text{g/100 ml})$$

és

$$c_{\text{kapszantin}} = \frac{A_{445} - 2550 c_{\text{lutein}}}{1353.3} \quad (\text{g/100 ml})$$

A hígítás mértékének és az extraktum teljes tömegének ismeretében a piros és sárga karotinoidok teljes mennyisége a szokásos μg (karotinoid)/g (extraktum) mértékegységben adható meg.

6. A karotinoid-monoszacharid konjugátumok előállításánál mi magyarázhatja az egyszerű Cu(I)-sók nem működtek kielégítően, míg a bisz-trifenilfoszfano-réz(I)-butirát hatékony katalizátornak bizonyult?

A magyar fejlesztésű réz(I)-butirát komplex általában jobban működik klikk-reakciókban, amit magyarázhat a jobb oldhatóság, a trifenil-foszfín stabilizáló hatása a réz(I)-ionra és az is, hogy

a komplex egy „beépített” bázist tartalmaz a butirát formájában (az alkin deprotonálódásának elősegítésére más esetben bázist szoktunk hozzáadni).

7. A 69. oldalon a szerző azt írja, hogy a kurkumin-konjugátumok általában hasonló R_f -értékkel rendelkeztek, mint a kurkumin, ezért az elválasztás csak preparatív vékonyrétegen volt lehetséges. Mire alapozza ezt az állítást, és milyen alternatív szeparációs megoldásokat tart elképzelhetőnek?

Ebben az esetben sokféle eleggyel próbálkoztunk VRK-n de csak csekély elválást tapasztaltunk és meglehetősen apoláros anyagok miatt kicsi volt a mozgástér a változtatásra. Ilyen esetekben próbálkozunk kalcium-karbonátos elválasztással is, de itt nem hozott eredményt. A preparatív vékonyrétegen 50-100 mg-ot is el lehet választani, így elég hatékony módszer, mint utolsó tisztítási lépés. Valószínűleg jó elválást lehetne elérni preparatív HPLC-n is, de annak túl kicsi a kapacitása.

8. Hogyan változik a kémiai stabilitása az újonnan szintetizált származékoknak a natív kiindulási karotinoidokhoz képest? A tapasztalatok alapján meghatározhatóak-e általános szabályok ezzel kapcsolatban?

Munkánk során a származékokat a biztonság kedvéért úgy kezeltük, mint a kiindulási karotinoidokat (fénytől védve, inert gáz alatt tároltuk őket), de valójában az észterszármazékok vagy a szukcinátok, glikozidok stabilabbak, mint a natív karotinoidok. A természetben is zsírsavakkal észteresítve fordulnak elő. Az irodalomban az általános tapasztalat az, hogy az észtereknek nagyobb a termikus és az oxidatív stabilitása is. Direkt mérést nem végeztünk a stabilitás meghatározására, de mi is hasonló tendenciákat tapasztaltunk.

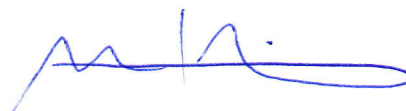
9. Meglepőnek tűnő eredmény, hogy az aggregálódott karotinoidok bizonyos körülmények között fokozott antioxidáns hatást mutatnak. Lehet-e ennek más elméleti magyarázata a közeli karotinoidmolekulák között hatékony elektronátadáson kívül, amit az értekezés említ?

Ismert, hogy az intermolekuláris kölcsönhatások befolyásolják a határmolekulapályák energiaszintjeit. Ez összefügg az antioxidáns viselkedéssel, mivel minél alacsonyabb a karotinoidban a HOMO energiaszintje, annál magasabb az oxidációs potenciálja. Elméleti számítások szerint a poláros környezettel, pl. vízmolekulákkal való kölcsönhatás csökkenti a karotinoidok oxidációs potenciálját (*Antioxidants*, **2020**, 9, 625)

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a karotinoidok aggregációja befolyásolja a határmolekulapályák energiaszintjeit azáltal, hogy csökkenti a víz és a karotinoidok közötti érintkezést, valamint magát az aggregációt segítő, karotinoidok közötti π - π kölcsönhatások

által is. Mindkét tényező alacsonyabb HOMO-energiaszintet és magasabb oxidációs potenciált eredményez. Ezért a $\text{Car}^{+}/(\text{Car})_n$ rendszer oxidációs potenciálja alacsony n értékeknél magasabb lehet, mint a $\text{Car}^{+}/\text{Car}$ rendszeré. Az aggregátumokban lévő molekulák közelsége intermolekuláris kölcsönhatások révén stabilizálhatja a képződött gyököt. Az aggregáció azonban el is rejtí a karotinoid molekulákat, így két ellentétes hatása van a reaktivításra. Úgy tűnik, hogy az 5–7 molekulából álló, kb. 10–20 nm méretű aggregátumok optimálisak ahhoz, hogy magas oxidációs potenciált és fokozott antioxidáns aktivitást mutassanak egyelektronos átviteli mechanizmus révén.

Pécs, 2026.6.10.



Dr. Agócs Attila