

Bírálat Dr. Perjési Pál A szerkezet, lipofilitás, tiol-reaktivitás és daganatsejt citotoxicitás közötti kapcsolatok tanulmányozása kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok körében című doktori értekezéséről.

A disszertáció teljes terjedelme 147 oldal, amely tartalmazza az értekezés alapjául szolgáló 39 irodalmi hivatkozást, az értekezés témájához kapcsolódó 37 saját közlemény listáját, és az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó 84 saját közlemény listáját. Ezt követi a dolgozat témájával kapcsolatos 418 irodalmi hivatkozás. A benyújtott értekezés 39 nemzetközi szakfolyóiratban megjelent közleményen alapul, ezek közül 2 review, valamint 3 könyv-fejezetben megjelent összefoglaló közlemény. A kísérleti munkán alapuló közleményekben 24-ben a Jelölt első vagy levelező szerző. Dr. Perjési Pál összesített tudományos publikációinak a tudományometriai adatai egy rendkívül produktív, koncentráltan dolgozó kutatóra utalnak. A jelölt az MTMT adatbázis szerint 118 referált nemzetközi folyóiratban megjelent publikációval rendelkezik, független idézettsége 1570, Hirsch-indexe 25, mindezen mutatók legnagyobb részét a legutóbbi tudományos fokozat megszerzése után teljesítette. Kiemelendő, hogy főleg hazai környezetben végezte tudományos munkáját és alapított önálló kutatócsoportot, de több nemzetközi kutatócsoporttal (Kanada, Szlovákia és Brazília) is folytatott, illetve jelenleg is folytat kooperációt. Kutatási eredményeinek jelentős része a Pécsi Tudományegyetem Orvosi Kémiai (ma Orvosi és Biokémiai) és a Gyógyszerészi Kémiai Intézeteiben végzett munkájával kapcsolatos.

A témaválasztás korszerűsége és újdonságtartalma kétségbevonhatatlan mivel a kalkonok ígéretes, jól tolerálható növényi eredetű természetes anyagok, néhány vegyületet már a terápiában is alkalmaznak. A kalkonszármazékok gyulladáscsökkentő, antioxidáns és antiproliferatív hatással rendelkeznek és ezek a vegyületek nagy szelektivitást mutatnak a beteg sejtekkel szemben anélkül, hogy jelentős toxicitást mutatnának a normál szövetekre. A kalkonok gyógyászati alkalmazásai ellenére széles bioaktivitási spektrumuk potenciálisan válogatás nélküli célpontprofil jelez, ami kihívást jelent a gyógyszerkutatók számára. Ez nagyrészt az α,β -telítetlen karbonilrendszer elektrofil természetének tulajdonítható, amely képes irreverzibilis kötéseket kialakítani biológiai makromolekulákkal, ami számos toxikus hatást eredményez, például allergén reakciókat, karcinogenitást és mutagenitást. A reakcióképeességet jelentősen befolyásolja az aromás gyűrűk szubsztitúciója, ezért az új analógok tervezése és szintézise különösen fontos a biológiailag aktív kalkonszármazékok fejlesztése szempontjából.

Az értekezés felépítése hagyományos. A négy oldal Bevezetés után a kutatási téma háttere következik 14 oldalon. Ebben a részben a Jelölt röviden bemutatja a kalkonok kémiájával, spektroszkópiai jellemzőivel és gyógyszerészi jellemzésével, kapcsolatos ismereteket, valamint a kutatás biológiai hátterét. A kutatási projekt célkitűzéseit 11 pontban foglalja össze. Ezt követi egy hét oldalas fejezet, ahol a Módszerek-ben megismerhetjük a kísérleti munka kivitelezését, főképp a biológiai vizsgálatokkal kapcsolatban. Az 5. fejezetben található az Eredmények és diszkusszió melyben hat alfejezetben tárgyalja a kalkonok és a gyűrűs kalkon analógok szintézisét, spektroszkópiai jellemzését, a vegyületek fizikai-kémiai

paramétereinek a meghatározását. Tanulmányozta a kalkonok és gyűrűs kalkon analógok daganatellenes hatás és kémiai szerkezet összefüggéseit, és a kiválasztott vegyületek metabolizmusát. Vizsgálta a kalkonok és a gyűrűs kalkon analógok tiol reaktivitását glutathion és N-acetil cisztein tiol reagensekkel. A 6. fejezet az Összefoglalás a 7. fejezet Az eredmények hasznosíthatósága. A dolgozat zárófejezete az Irodalomjegyzék.

Új tudományos eredmények

1. A Jelölt szintetikus módszereket dolgozott ki a benzilidén-molekularészen (B gyűrű) nitro-, hidroxil- és dimetilamino-szubsztituált kalkonok és analóg (E)-2-(4'-X-benzilidén)-1-indanonok, 1-tetralonok és 1-benzoszuberonok előállítására, valamint oszlopkromatográfiás tisztítására. A módszerek eredményesen alkalmazhatók voltak a tetralonszármazékok a kromanonok és a tiokromanonok, valamint a benzilidén-molekularészt ferrocénmetilén-molekularésszel helyettesített analógok előállítására. A vegyületek jelentős része új, eddig nem publikált származék, melyek szerkezetét és sztereokémiáját a Jelölt a modern anyagszerkezet-vizsgáló módszerekkel (NMR, IR, UV és tömegspektrometria) igazolta.
2. A 4-N(CH₃)₂-benzilidén-kalkon, valamint a (E)-2-(4-N(CH₃)₂-benzilidén)-1-indanon, 1-tetralon és 1-benzoszuberon származékok különböző oldószerekben felvett UV-látható abszorpciós maximumainak oldószer-indukált batokróm eltolódása a toluol<CH₃CN<metanol≈DMSO sorrendet követte. Ezek a megfigyelések jól értelmezhetők a vizsgált oldószerek és a kérdéses vegyületek karbonilcsoportja között kialakuló kölcsönhatások eredményeként.
3. Az (E)-2-(4'-X-benzilidén)-1-indanonok, 1-tetralonok és 1-benzoszuberonok elektron- és térszerkezetének tanulmányozása céljából a vegyületek IR karbonil vegyértékrezgési sávjai, valamint az enon-molekularész ¹³C NMR kémiai eltolódásértékei alapján, egy- és kétdimenziós regressziós analízis segítségével vizsgálta a C-4'-szubsztituensek elektronikus hatásainak tovaterjedését. A kapott adatok alapján megállapítható volt, hogy a benzilidén-szubsztituensek induktív és rezonancia hatásai a leghatékonyabban az öttagú, a legkisebb hatékonysággal a héttagú gyűrűs származékok körében érvényesülnek. Az induktív hatások a béta-szénatomon történő érvényesülésének erőssége párhuzamosságot mutatott a vegyületek tiol-reaktivitásával.
4. Az (E)-2-(4'-X-benzilidén)-1-indanonokat, 1-tetralonokat és 1-benzoszuberonokat napfényen tartva megfigyelte az E-Z izomerizációt, amely már a vékonyrétegekromatográfiás vizsgálat során kimutatható. Az izomerizációt korábban már a kalkonok esetében is észlelték. Az izomerpárok szerkezetét gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás, valamint ¹H-NMR vizsgálatokkal igazolta. Az izomerelegyek összetételének pontosabb megismerése céljából fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) módszert dolgozott ki az (E) és (Z) izomerek elválasztására. Kétdimenziós vékonyréteg-kromatográfiás módszer alkalmazásával igazolta, hogy az izomerizáció reverzibilis folyamat.

5. A 2-(4'-X-benzilidén)-1-indanonok, 1-tetralonok és 1-benzoszuberonek (E) és (Z) izomerjeinek lipofilitását RF-VRK és HPLC-UV-Vis módszerekkel határozta meg. A vegyületek RF-HPLC módszerrel mért retenciós tényező (k') értékeinek összehasonlításával felismerte, hogy a gyűrűtagszám és az enon-molekularész konfigurációjának megváltoztatásával (az (E)-konfigurációjú vegyületek (E)/(Z)-izomerizációjával) a nyíltláncú kalkonoktól eltérő lipofilitással rendelkező származékai állíthatók elő. A (Z) izomerek (E) izomerekhez viszonyított lipofilitása a gyűrűtagszám növekedésével párhuzamosan csökkent.
6. Nagyszámú, a benzilidén-molekularészen különbözőképpen szubsztituált (E)-2-(X-benzilidén)-1-indanon, -1-tetralon, 1-benzoszuberone, valamint a benzilidén-molekularészen különbözőképpen szubsztituált (E)-2-(X-benzilidén)-4-kromanon és 4-tiokromanon származékot szintetizált, melyek különböző rágszáló és humán karcinóma sejtvonalakon daganatellenes hatásának bizonyultak. Az 5-,6- és a 7-tagú karbociklusos kalkon analógok in vitro citotoxicitásának P388, L1210 leukémia sejtekkel, valamint Molt 4/C8 és CEM T-limfocitákkal szemben végzett vizsgálatai alapján a héttagú gyűrűs, 4'-helyzetben metoxi-, valamint dimetilamino-szubsztituált benzoszuberone-származékok bizonyultak a leghatékonyabb citotoxikus származékoknak. A C-2-arilidén-benzoszuberone és a C-2-arilidén-cikloheptanon származékok IC_{50} értékeinek összehasonlítása azt mutatta, hogy a cikloheptanon gyűrűvel kondenzált benzolgyűrű jelenléte megnöveli a vegyületek daganatsejtekkel szemben mutatott citotoxicitását.
7. Az 1-indanon, -1-tetralon, 1-benzoszuberone valamint a 4-kromanon és 4-tiokromanon Claisen-Schmidt reakciójában ferrocen-carbaldehiddel gyűrűs kalkon analógokat állított elő, az új vegyületek szerkezetét E-s-cisz konfigurációját IR és NMR vizsgálatokkal igazolta. A megfelelő ketonok C-2-arilidénszármazékai és a ferrocenil analógok L1210 sejtekkel, illetve Molt 4/C8 és CEM T-limfocitákkal szemben kapott IC_{50} értékei hasonló nagyság-rendűnek bizonyultak. A ferrocenil-kalkonok nem mutattak spontán-tiol reaktivitást.
8. A daganatsejtekkel szemben mutatott toxikus hatások molekuláris mechanizmusának megismerése céljából vizsgáltak két különböző toxicitással bíró (E)-2-(4'-X-benzilidén)-1-benzoszuberone származék (X=metil, metoxi) Jurkat T-sejtek sejtciklusára gyakorolt hatását. A két vegyület ekvitoxikus dózisa hatásának vizsgálata során megállapították, hogy a vegyületek erős apoptózist indukáló szerek. A hatékonyabb vegyület (4-metoxi-benzilidén-benzoszuberone) esetén kifejezett G2/M fázisú sejtciklus gátlás és poliploid sejtek képződése volt megfigyelhető.
9. A 4'-metoxi-szubsztituált héttagú gyűrűs kalkonszármazék, a 4-metoxi-kalkon és a hasonlóan szubsztituált indanon és tetralon karbociklusos analógok erős in vitro CYP 1A enzimgátló hatást mutattak. A hatást a benzoszuberone származék tumorspecifikus gének expressziójára gyakorolt hatása alapján in vivo állatkísérletekben is igazolták. A vegyület csökkentette a 7,12-dimetilbenz[a]antracén (DMBA) okozta expresszió növekedését a c-myc, Ha-ras és p53 géneknek. Az eredmények alapján a benzoszuberone analóg hatékony duális (kemopreventív és daganatsejt citotoxikus) hatású vegyületek tervezésének és szintézisének kiindulási anyagának tekinthető.

10. In vivo állatkísérletes modellen vizsgálta a 4'-hidroxi-4-metoxikalkon és a 4'-hidroxi-4-klórkalkon 3',5'-bisz-dimetilaminometil-kalkon vékonybélből történő felszívódását és metabolizmusát. Megállapította, hogy a két kalkonszármazék vékonybélből történő felszívódása jellegzetes különbségeket mutat: a bisz-Mannich-származék felszívódása lassúbb. A vegyületek szulfát-, glükuronid- és glutathion-konjugátumait HPLC-MS módszerrel azonosították a perfúziós oldatokban.
11. A C4-helyzetben szubsztituált kalkonok a 4-metil- és 4-metoxikalkon, a 4'-hidroxi-4-klór-kalkon és a 4'-hidroxi-3-metoxi-kalkonok, a 4'-hidroxi-3',5'-biszdimetilaminometil-4-klór-kalkon a 4'-hidroxi-3',5'-biszmorfolinometil-3-metoxi-kalkonok, valamint a 2'-benzolszulfonamido-3-nitro-kalkon és a 2'-benzolszulfonamido-4-nitro-kalkon és a 4-oxo-tetrahidrokinolin C-2-arilidén származékának addíciós reakcióját vizsgálta glutathionnal és N-acetil-ciszteinnel, mint reaktív tiolvegyületekkel. A különböző pH értékeken lejátszódó reakciói során azt tapasztalta, hogy a benzolszulfonamido-nitrokalkonok és a 4'-hidroxi-kalkonok bisz-Mannich származékai még savas (pH 3,2) körülmények között is szignifikánsan reaktívabbak, mint a vizsgált négy kalkon származék. A két bisz-Mannich kalkon analóg glutathionnal lejátszódó reakcióját az addíció sztereoselektivitásának megnövekedése kísérte, ami feltételezhetően a vegyületeknek a glutathion protonált amino- és tiolcsoportjával kialakított kölcsönhatásainak a következménye.
12. Összehasonlították a 4-metil- és 4-metoxikalkon a karbociklusos 2-(4-X-benzilidén)-1-tetralonok és benzoszuberonek különböző pH értéken lejátszódó Michael-addíciós reakcióinak kezdeti sebességét és az egyensúlyi elegyeik összetételét. A kalkonok reaktivitása nagyobb, mint gyűrűs tetralonoké a benzoszuberonek származékok reaktivitása a legkisebb. A tapasztalatok szerint a negatív töltésű átmeneti termékek az α -helyzetű alkilcsoportok elektronküldő hatása és a cikloalkén gyűrűk konformációs korlátozása okozta magasabb energiatartalmával értelmezhetők. Minden sorban a 4-metil-szubsztituált-származékok tiol-reaktivitása meghaladta a 4-metoxi-szubsztituált vegyületekét. Ezt a 4-metoxicsoport hatékonyabb elektronsűrűség-növelő hatásával magyarázták. Fontos megfigyelés, hogy a gyűrűs kalkon származékok diasztereoselektivitása a pH csökkenésével nő, a diasztereomerek aránya 8,57 és 4,9-szeres felesleget jelez.

Formai észrevételek

Az értekezés szerkesztése megfelel az előírt formai követelményeknek. A dolgozatban 37 táblázat és 63 ábra található, a 8 számú 4-kromanonok esetén a 2. ábrán és a 18. táblázatban a szubsztituensek számozása nem azonos. A dolgozatban a Jelölt a 4 általános képletű kalkonokra sajátos számozást használ, ugyanis az A gyűrű szubsztituenseire a C1 – C6 jelölést használja és a B gyűrű szubsztituenseire a számozás C1' – C6'. Ez eltér a IUPAC nevezéktan számozástól, és a bíráló helyzetét nehezíti amikor a szakirodalomban az ellenkező IUPAC számozást talál. Mivel a Jelölt a dolgozatban következetesen használja a saját számozását ez a dolgozat olvasásakor nem jelent problémát. A 2-arilidén benzo-cikloalkanonok esetén sem zavaró ez a számozás. Megemlítem, hogy a megjelent D1 – D39

közleményekben viszont a IUPAC számozást alkalmazza. A tézis-füzetben viszont a 4 általános képletre viszont IUPAC számozást használ.

A 110. oldalon az Összefoglalás részben a 3.12 ponthoz a D26 közlemény tartozik, nem a D27. A tézisfüzetben a 3.12 pont esetén szintén a nem megfelelő D27 közlemény található, mint irodalmi hivatkozás. A D26 közleményben (Open Med. Chem. J. 2022) a dolgozat címe alapján 4'-hidroxi-4-metoxi-kalkon 3',5'-bisz-dimetilaminometil származékának a metabolizmusát vizsgálták. A Mannich bázis képletében viszont nem 4-metoxi hanem 4-klór szubsztituenst ábrázolnak.

A dolgozatban több hibás képletet találtam: 23. oldal 15. ábra a phlorizin képletben a dihidrokalkon B gyűrűjében a fenolos OH nem meta helyzetű

24. oldal 16. ábra a hidroxisaffrol sárga A képlete hibás

25. oldal 17. ábra a szofalkonban a C2' hidroxilcsoportot karboximetil-csoport O-alkilezi (Medline pubchem képlet)

27. oldal 18. ábra a kolchicin C gyűrűjében nincsenek kettőskötések.

38. oldal 19. ábra a **27** vegyület nem ciklohexénon mivel nem tartalmaz kettőskötést

87. oldal 42 ábra a 16b vegyület nem para klór szubsztituenst tartalmaz a B gyűrűben, hanem meta metoxicsoportot. A 16b vegyület bisz-piperidinometil származékként van ábrázolva, holott a szövegben és az eredeti közleményben a szintetizált vegyület bisz-morfolinometil Mannich bázis.

A dolgozatban csak elvétele találunk gépelési hibákat, elírásokat. Néhányat felsorolok:

9. o. Baas és Cerfontain; 13.o. Hansch; 22.o. 3.sor hatás; 58.o. passzív diffúzió;

66.o. daganatsejt citotoxicitás; 71.o. 13. sor hosszútávú; 111.o. lipofilitás nem szteroid

A dolgozattal kapcsolatos kérdések és megjegyzések:

1. Van-e korreláció a fordított fázisú vékonyréteggromatográfiás módszerrel meghatározott logP értékek a 2-arilidén benzocikloalkanonokra és az izokratikus fordított fázisú folyadék-kromatográfiával mért k' értékek között? A B gyűrű C-4 szubsztituenseinek a hatásai hogyan érvényesülnek?
2. Vizsgálták-e a Z-cisz kalkonszármazékok biológiai hatásait? Iwata et al Biol. Pharm. Bull. 1997, 20, 1266. közleménye szerint a Z kalkonok hatásosabban gátolták rákos sejtek proliferizációját mint a megfelelő E kalkonok.
3. Halgas B. és munkatársai (J. Chromatography B 2005, 819, 283) megmérték a 2-arilmetilén-alfa-tetralonok lipofilitását fordított fázisú HPLC alkalmazásával és meghatározták a k' retenciós faktorokat. A Jelölt által szintetizált (D17 közlemény) 2-arilmetilén-alfa-tetralonokra szintén közölte a fordított fázisú HPLC módszerrel mért k' értékeket. Öt vegyület esetén melyeket mindkét kutatócsoport vizsgált (4X= H, metil, metoxi, F, Cl) a k' értékek jelentősen eltérnek, de a kromatográfiás oszlopok és a mobil fázisok is különböznek. Van-e korreláció a kétféle adatsor között?
4. Az E kalkon → Z kalkon fotoizomerizációra milyen lehetséges mechanizmust javasol? A 4-dimetilamino-benzilidénszármazékok esetében az izomerizáció nem megvalósítható. Mi a dimetilamino-csoport szerepe a reakció elmaradásának?

5. Lehetséges-e szerves kémiai szintézissel tiszta Z-kalkonokat előállítani? Az E kalkon $\rightarrow$ Z kalkon izomerizációt hogyan befolyásolják az A és B gyűrű szubsztituensei?
6. Az IC₅₀ értékek meghatározásakor (18. táblázat) miért használták az irreverzibilis, rendkívül hatásos melphalant mint referenciavegyületet? A 16., 17. és 25. táblázatban viszont hiányzik a referenciavegyület.
7. Az alfa-béta telítetlen kettőskötésű ketonok esetében bizonyították a genotoxicitást és a mutagén hatást. Idézem Eder E. et al. Toxicology Letters 1993, 67, 87-103. dolgozatát, melyben főleg az egyszerűbb vegyületeket sorolták fel, de vizsgálták a fahéjaldehidet is. Említem, hogy a 4-nitrokalkon (B-gyűrűben szubsztituált) erős mutagén hatású, de a 4'-nitrokalkon viszont nem Rashid K.A. et al Mutation Res. 1986, 161-169. A kalkonok és a 2-arilidén-benzocikloalkanonok esetében történtek-e ilyen vizsgálatok? A jelölt a D1 közleményében áttekintette a természetes és félszintetikus kalkon származékok biológiai hatásait. Végeztek-e az in vivo kísérletek során toxicitás vizsgálatokat, esetlegesen letális dózis meghatározásokat?
8. Mivel magyarázható, hogy a citosztatikus hatású 4'-hidroxi-3',5'-bis-dimetilaminometil-kalkon pH=7,4 értéken glutathionnal inkubálva (10-szeres felesleg) 37 °C-on 48 órán keresztül nem mutat addíciós reakció? Ez a vegyülettípus (Mannich bázis) a D26 és D34 közlemények szerint a legnagyobb reaktivitású származék. A glutathion a kalkonnal csak GST izoenzim jelenlétében reagált. Dimmock, J.R. et al: J. Med. Chem. 1998, 41, 1014.
9. A bisz-dimetilaminometil-szubsztituált kalkon (17 sz. vegyület a dolgozatban) glutathionnal és N-acetilciszteinnel képződő diasztereomer adduktokat kromatográfiával sikerült izolálni. Ezzel kapcsolatban kérdezem, hogy készült-e NMR felvétel pl. az egyszerűbb szerkezetű N-acetilcisztein adduktról? Ez további szerkezetbizonyítást jelentene a tömegspektrum mellett.
10. A 4'-hidroxi-4-metoxi kalkon és a 4'-hidroxi-3',5'-dimetilaminometil-4-klór kalkon metabolitjainak a szerkezetét HPLC MS ESI molekulatömegek meghatározásával igazolta. Mindkét kalkon esetén a kromatogramon két csúcsot figyelt meg, és a 4'-hidroxi-4-metoxi kalkon glükuronid konjugátuma is két metabolitra utal. Milyen izomériával kell számolni ezekben az esetekben? A szulfátészterek és a glükuronid konjugátumok további szerkezetigazolás lehet az arilszulfatázzal vagy béta-glükuronidázzal történő enzimatisz hidrolízis, de jelen esetben a rendelkezésre álló kevés minta miatt ez nem kivitelezhető.
11. A 4-metil-kalkon és a 4-metoxi-kalkon glutathionnal vagy N-acetil-ciszteinnel inkubálva a normál tio-adduktok mellett a két E izomer kalkon Z izomerjei is megjelennek a reakcióelegyben, melyeket a Jelölt fotoizomerizációval előállított és a HPLC retenciós idővel sikerült azonosítani a melléktermékeket. A dolgozatban a 37. ábrán bemutatott reakciómechanizmus szerint a Z (cisz) izomerek retro-Michael reakcióban keletkeznek. Milyen sztereokémiai megfontolások alapján képződik a termodinamikailag kevésbé stabil cisz izomer? A 4'-hidroxi-4-klór-kalkon és a 4'-hidroxi-3-metoxi-kalkon glutathionnal vagy N-acetil-ciszteinnel inkubálva nem figyelhető meg a Z izomer kalkonok képződése. Ezeket az adatokat hogyan lehet magyarázni?

A bemutatott kutatási eredmények rendkívül szerteágazóak: a Jelölt alkalmazta a szerves kémia, az elméleti szerves kémia, és a szerkezetbizonyító módszerekkel kapcsolatos ismereteit, tanulmányozta az előállított vegyületek fizikai-kémiai tulajdonságait és a biológiai hatás kémiai szerkezet közötti összefüggéseket, valamint vizsgálta a kalkonok farmakokinetikáját és a kalkonok tiol-reaktivitásának a reakciókinetikáját.

Dr. Perjési Pál doktori dolgozatában nagy mennyiségű, új szintetikus munkáról számol be, és részletesen ismerteti a célvegyületek biológiai és szintetikus kémiai hasznosságát és széleskörű alkalmazási lehetőségeit. Az elvégzett munka mennyisége és minősége messzemenően megfelel az MTA doktori cím követelményeinek. A mű valamennyi tézisét elfogadom új tudományos eredményként. A dolgozat nyilvános vitára bocsátását, és sikeres megvédése esetén az akadémiai doktori cím odaítélését egyértelműen javaslom és támogatom.

Budapest 2026. 06. 10.



Dr. Hosztafi Sándor, MTA doktora

Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet