



Bírálat Dr. PERJÉSI PÁL

**“A SZERKEZET, LIPOFILITÁS, TIOL-REAKTIVITÁS ÉS DAGANATSEJT
CITOTOXICITÁS KÖZÖTTI KAPCSOLATOK TANULMÁNYOZÁSA KALKONOK
ÉS GYŰRŰS KALKON-ANALÓGOK KÖRÉBEN” című MTA doktori értekezéséről**

Dr. Perjési Pál a Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerészi Kémia Intézetének professzora egy 147 oldalas, 418 független irodalmi hivatkozást tartalmazó értekezést nyújtott be az MTA doktora cím elnyerésére, amelyben az MTA kandidátusi fokozatának megszerzését követő, több mint 30 évet felölelő kutatómunkájának kalkon-származékokkal kapcsolatos eredményeit foglalta össze.

Az értekezés témája kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok UV-VIS, IR és NMR spektroszkópiai jellemzése, farmakokinetikai tulajdonságaik tanulmányozása, továbbá daganatellenes hatásaik és tiolokkal szembeni reaktivitásuk vizsgálata. A doktori mű alapjául 39 angol nyelvű közlemény szolgál, ebből 30-ban a Jelölt meghatározó szerző; a közlő lapok között olyan rangos folyóiratokat találhatunk mint a *J. Med. Chem.* és az *Eur J. Med. Chem.* Ebben az irodalmi listában kutatási cikkek, áttekintő (review) közlemények és könyvfejezetek is megtalálhatók. Az értekezés témájában Perjési Pál szerkesztésében két könyv is megjelent: **Glutathione: Biosynthesis, Functions and Biological Implications** (Nova Science Publishers: Hauppauge, New York, 2019); valamint **Chalcones and their synthetic analogs** (Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA, 2020) címmel; ami önmagában is jól bizonyítja a Jelölt szakértelmét és nemzetközi beágyazottságát a kalkon-származékok, és tiolokkal való reakcióik kutatása terén.

A disszertáció első fejezete a kalkonok és gyűrűs kalkon analógok szintézisére, fizikai-kémia és gyógyszerészeti jellemzésére és daganatellenes hatásaira vonatkozó szakirodalmi háttérrel ismerteti 29 oldalon, megfelelő mélységben. Ezt követően, a *Célkitűzés* (1 oldal) és *Módszerek* (7 oldal) fejezet után, az *Eredmények és Diskusszió* rész mutatja be az új kutatási eredményeket 6 alfejezetre bontva, közel 70 oldalon. Az első három alfejezet (5.1.-5.3. fejezetek) a kalkonok és analógjaik szintézisét, izomerizációs vizsgálatait, és különböző spektroszkópiai módszerekkel végzett tér- és elektronszerkezeti jellemzését foglalja össze. A szintetikus rész véleményem szerint túlságosan tömör, az eredmények lényegét ugyan jól bemutatja, de fontos



részletek, pl. a reakciók hozama, az exo- és endo-kettőskötésű (8, 9 és 19, 20) izomerek aránya, homályban maradnak. A másik probléma, hogy a vegyületek, a 27 és 28 kivételével, csak számokkal vannak megjelenítve, ez megnehezíti az olvasó dolgát, vissza kell lapoznunk az irodalmi áttekintés ábráihoz, ha tudni akarjuk, hogy mit takarnak az 5-9, 12-16, 18-19 vegyületszámok. Nagyon hiányolom ebből a részből a reakcióábrákat, néhány jól szerkesztett ábrával az említett problémák orvosolhatók lennének. A további kémiai célzatú vizsgálatok leírása megfelelően részletes, jól követhető, gazdagon adatolt táblázatok segítik a spektroszkópiai módszerek széles tárházát alkalmazó kutatás eredményeinek megértését. Az *Eredmények és Diskusszió* következő három alfejezete (5.4.-5.6. fejezetek) a kalkon-származékok farmakokinetikai és farmakológiai tárgyú kutatásait ismerteti, nagyon részletesen, spektrális és hatástani ábraanyaggal gazdagon illusztrálva. A kémiai szerkezetek bemutatásával azonban itt is fukarul bánik a szerző, ez különösen igaz az 5.5.4. fejezetre, ahol a gyűrűs kalkonok ferrocén analógjainak szintézisét és biológiai hatásait tárgyalja, de a szerkezetek bemutatása nélkül, így ismét a bevezető rész 2. ábrájához kell visszalapozni, hogy felidézzük a tárgyalt vegyületek (5-9 és 10-14) képletét. A dolgozat utolsó két fejezete (6. *Összefoglalás*, 3 oldal; 7. *Eredmények hasznosíthatósága*, 2 oldal) összegzést és kitekintést ad az elvégzett munkáról. Az *Összefoglalás*ban a szerző 14 pontba szedve mutatja be a legfontosabb eredményeket, ezek a pontok azonosak a tézisfüzet tézispontjaival. A dolgozat egy négy részre tagolt irodalomjegyzékkel zárul, melynek első három része a Jelölt saját közleményeit sorolja fel az alábbi bontásban: *Az értekezés alapját képező közlemények* (D1-D39), *Az értekezés témájához kapcsolódó saját közlemények* (S1-S37), *Az értekezés témájához nem kapcsolódó saját közlemények* (N1-N84); az utolsó rész tartalmazza a dolgozatban idézett 418 független irodalmat. Ez nagyon jó megoldás, mert a dolgozatban világosan elkülönülnek a saját és a független hivatkozások.

A disszertáció nagyon gondosan szerkesztett, vegyületszámozási vagy gépelési hibát csak elvétve tartalmaz (ezeket jeleztem a dolgozatban), az ábrák szép kivitelűek. A fogalmazás gördülékeny, és kifejezetten érezhető rajta a szakszerű és pontos nyelvhasználatra való törekvés. Ennek ellenére (vagy talán éppen ezért) előfordul néhány magyartalan vagy körülményes megfogalmazás. Erre néhány példa, és a javasolt módosítások:

5., 6. és 96. oldal: konformatíve, helyette: konformációsan



25. oldal: „Azonban a legtöbb esetben a (természetes) vegyületek citotoxikus hatása, kémiai stabilitása, per os biológiai hasznosulása és metabolikus stabilitása távol áll a szintetikus vegyületekétől.” Helyette: jelentősen elmarad a szintetikus vegyületekétől

26. oldal : „a potenciálisan daganatellenes természetes és szintetikus kalkonok hatásainak más szempontból történő rendezése azt mutatta, hogy a vegyületek között megtalálhatók a kémiai karcinogenezis minden alapvető lépésének (inicializáció, promóció, progresszió) gátlásán alapuló hatással bíró származékok. Helyette: ... a kémiai karcinogenezis minden alapvető lépését (inicializáció, promóció, progresszió) gátló származékok

28. oldal: “Ezeknek az átalakításoknak az egyik in vitro és in vivo körülmények között is dokumentált átalakulása”, helyette: dokumentált példája (vagy esete)

79. oldal: “freeze-thaw” ciklus; helyette fagyasztás-kiolvadás ciklus

90. oldal: deaminációval, helyesen: dezaminációval

A felsorolt formai megjegyzések nem kisebbítik annak a hatalmas munkának az értékét, amit a Jelölt a kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok szintézise, és széleskörű szerkezeti és gyógyászati jellemzése területén végzett. A kémiai irányultságú kutatások közül különösen értékesnek tartom a karbociklusos kalkon-analógok izomerizációjának vizsgálatát, és az (E) és (Z) izomerek elválasztására alkalmas fordított fázisú HPLC-módszer kidolgozását. A farmakokinetikai és –dinámiai vizsgálatok körében kiemelendő a Jelöltnek a szerkezet-hatás összefüggések és a hatásmechanizmusok minél alaposabb feltárására irányuló törekvése, és ebben a kromatográfiás és spektroszkópiás módszerek széles arzenáljának szakavatott és leleményes alkalmazása. Gyakorlati hasznosítás szempontjából különösen jelentősnek tartom a vegyületek vékonybélből történő felszívódásának és metabolizmusának vizsgálatára kidolgozott állatkísérletes modellt, ami általánosan alkalmazható lehet gyógyszerjelöltek preklinikai vizsgálatában.

Az elért új eredményeket az alábbi 12 pont szerint ismerem el:

1. Szintetikus módszereket dolgozott ki korábban alacsony hozammal előállítható, a benzilidén-molekularészen változatosan szubsztituált kalkonok és analóg 2-benzilidén-1-indanonok, -tetralonok és benzoszuberonok előállítására és oszlopkromatográfiás



tisztítására. A módszereket kiterjesztette oxigén- és kéntartalmú tetralonszármazékok, és ferrocénmetilén-tartalmú analógok előállítására.

2. Fordított fázisú vékonyréteg kromatográfiás (RF-VRK) módszer alkalmazásával igazolta, hogy a szintézisek során izolált (E)-konfigurációjú 2-benzilidén-1-benzocikloalkanonok fény hatására reverzibilis (E)/(Z)-izomerizációt szenvednek. HPLC-UV módszert fejlesztett ki az (E)-izomerek tisztaságvizsgálatára, és (Z)-izomerektől történő elválasztására. A módszer segítségével meghatározta az (E)- és (Z)-2-(benzilidén)-1-indanon, -tetralon és -benzoszuberon geometriai izomerpárok fotostacionárius elegyeinek összetételét. GC vizsgálatokban összefüggést állapított meg az izomerek planaritása és retenciós ideje között.

3. A 2-benzilidén-1-benzocikloalkanonok (E)- és (Z)-izomerjeinek lipofilitását RF-VRK és HPLC-UV-Vis módszerekkel jellemezte. Megállapította, hogy a benzoszuberonszármazékok (E)-izomereinek lipofilitása átlagosan 0.65 logP értékkel magasabb a (Z)-izomerek lipofilitásánál. Az (E)-konfigurációjú vegyületek körében összefüggéseket ismert fel a vegyületek logP_{VRK} értékei, valamint a gyűrűtagszám és a benzilidén molekuláriszubsztituenseinek minősége és helyzete között. A benzoszuberonszármazékok esetén kimutatta, hogy egy adott szubsztituens esetén a logP_{VRK} értékek a orto ≤ para ≤ meta sorrend szerint változnak.

4. Elsőként írta le 4'-dimetilamino szubsztituált kalcion, 2-benzilidén-1-indanon – tetralon, és –benzoszuberonszármazékok UV-Vis abszorpciós maximumainak oldószer-indukált batokrómtolódását, és megállapította, hogy batokrómtolódások sorrendje jól értelmezhető a vizsgált oldószerek és a vegyületek karbonilcsoportja között kialakuló kölcsönhatásokkal.

5. A benzilidénygyűrűn változtatva szubsztituált (E)-2-(benzilidén)-1-indanonok, -tetralonok és –benzoszuberonok IR karbonil vegyértékrezgési sávjai, valamint az enonmolekulárisz ¹³C NMR kémiai eltolódásértékei alapján, egy- és kétdimenziós regresszióanalízis segítségével kimutatta, hogy a benzilidén-szubsztituensek induktív és rezonancia hatásai a leghatékonyabban az öttagú, míg legkisebb hatékonysággal a héttagú gyűrűs származékok körében érvényesülnek. Megállapította, hogy az induktív hatások β-szénatomon történő kifejeződése párhuzamosságot mutat a vegyületek tiolreaktivitásával.



6. Közel 150, a benzilidén-molekularészen különbözőképpen szubsztituált (E)-2-(benzilidén)-1-indanon, -tetralon, -benzoszuberon, valamint (E)-3-(benzilidén)-2,3-dihidro-1-benzopirán-4-on és -tiopirán-4-on származékot állított elő citotoxicitási vizsgálatokhoz, és számos vegyületet azonosított, amelyek rágszáló és human karcinóma sejtvonalakon *in vitro* daganatellenes hatást mutattak a P388 és L1210 sejtekkel, valamint Molt 4/C8 és CEM T-limfocitákkal szemben. A vizsgálatokban a 4'-helyzetben metoxi- és dimetilamino-szubsztituált benzoszuberon-származékok bizonyultak a leghatékonyabbnak.
7. Az 1. pont szerint ferrocenil kalkonokat állított elő, citotoxicitási vizsgálatoknak vetette alá L12010 sejtekkel, illetve Molt 4/C8 és CEM T-limfocitákkal, valamint meghatározta $\log P_{VRK}$ értékeiket. Elvégezte a ferrocenil származékok és rokon kalkon és kromanon származékok citotoxicitási és $\log P_{VRK}$ adatainak összehasonlító értékelését. A vegyületek citotoxikus hatását a ferrocenil molekuláris redox tulajdonságaival és/vagy a molekulák nem-kovalens kölcsönhatásaival értelmezte.
8. A molekuláris mechanizmusok megismerése céljából megvizsgálta két különböző citotoxicitású (E)-2-(benzilidén)-1-benzoszuberon származék (**7b** és **7c**) Jurkat T-sejtek sejtciklusára gyakorolt hatását, és megállapította, hogy a vegyületek erős apoptózist indukáló szerek. A hatékonyabb, 4'-metoxi-szubsztituált származék esetén a G2/M fázisú sejtciklus gátlását és poliploid sejtek képződését figyelte meg.
9. Kimutatta a 4'-metoxi-szubsztituált héttagú gyűrűs kalkonszármazék **7c**, valamint egy nyíltláncú és további karbociklusos analógok erős *in vitro* CYP 1A enzimgátló hatását. A hatást a **7c** vegyület esetén *in vivo* állatkísérletekben is igazolta.
10. *In vivo* állatkísérletes modellen elsőként tanulmányozta egy 4-hidroxikalkon (**4q**) és egy 4-hidroxikalkon bisz-Mannich-származék (**16a**) vékonybélből történő felszívódását és metabolizmusát, és megállapította, hogy a bisz-Mannich származékok felszívódása lényegesen lassúbb. A vegyületek szulfát-, glükuronid- és glutation konjugátumait HPLC-MS módszerrel azonosította a perfúziós oldatokban.
11. 4'-Helyzetben különbözőképpen szubsztituált kalkonok, 4-hidroxikalkonok és bisz-Mannich-származékaik, valamint 2-szulfonamido-3'- és 4'-nitrokalkonok és kinolinon gyűrűs analógaik GSH és NAC modell tiolvegyületekkel különböző pH értékeken lejátszódó reakcióit tanulmányozva felismerte, hogy a 2-szulfonamido-nitrokalkonok,



valamint a bisz-Mannich vegyületek még savas (pH 3,2) körülmények között is szignifikánsan reaktívabbak, mint a többi vizsgált származék.

12. Kalkonok és hat- és héttagú-karbociklusos kalkon-analógok (benzilidén-tetralonok és -benzoszuberonok) különböző pH értékeken lejátszódó tia-Michael reakcióinak összehasonlító vizsgálatával megállapította, hogy a nyílt láncú kalkonok tiol-reaktivitása a legnagyobb, a héttagú gyűrűs kalkon-analógok reaktivitása a legkisebb, és minden sorban a 4'-metil-szubsztituált származékok reaktivitása nagyobb, mint a 4'-metoxiszubsztituáltaké. Az eredményeket a cikloalkén gyűrűk konformációs gátoltságával és a 4'-metoxicsoport hatékonyabb elektronsűrűség-növelő hatásával értelmezte. A citotoxicitási adatokkal történő összehasonlítás alapján a legkiemelkedőbb daganatellenes aktivitású **7c** hatását a celluláris makromolekulákkal kialakított nem-kovalens kölcsönhatásaival magyarázta.

Az eredményekkel kapcsolatos kérdéseim megjegyzéseim a következők:

- 1.) Milyen hozamokat értek el a kalkonok (4) és gyűrűs kalkon-analógok (5-9; 12-16) Claisen-Schmidt reakcióval történő szintézisében? A kromanon és tiokromanon származékok esetében milyen arányban képződtek exo- (**8, 9**) és az endo- (**18, 19**) kettőskötésű struktúrizomerek? (Megjegyzés: az endo izomerek vegyületszámának megadása a 38. oldalon hibás.) A karbociklusos analógok esetében is képződtek-e endo-kettőskötésű izomerek?
- 2.) Milyen hozamokat értek el megfelelő gyűrűs kalkonok ferrocén-analógjainak (**10-14**) szintézise során. Ezek a reakciók mennyire voltak exo-szelektívek?
- 3.) A 27. és 28. ábrán bemutatott vizsgálatokban a vizsgált minta koncentrációja eltérő. Mi ennek az oka?
- 4.) A 16. táblázatban a **3** és **5-7** vegyületek (összesen 56 származék) 4 tumoros sejtvonalal szembeni citotoxikus tulajdonságát átlagpotenciál (ÁP) értékkel jellemzi. Az ÁP értékek reprezentatív jellegét azonban kérdésessé teszi a kiszámítás módja. A mérések hány százalékában találtak $IC_{50} > 50/500 \mu M$ értékeket? Nem lett volna helyesebb, ha az $IC_{50} > 50/500 \mu M$ értékeket nem veszik figyelembe az átlagpotenciál kiszámításakor?



- 5.) Az 5.5.2. fejezetben leírt citotoxicitási vizsgálatokban a heterociklusos kalkon-analógok közül csak a **8**-as kromanon származékok (12 vegyület) szerepelnek, a **9**-es tiokromanon-származékok viszont nem. Tervezik-e a **9**-es származékok hasonló citotoxikus vizsgálatát az oxa- és tia-analógok citotoxikus potenciáljának összehasonlítása céljából?
- 6.) A 20. táblázatban szereplő topológiai poláris felületet (TPSA) hogyan számolták ki?
- 7.) A szerző állítása szerint a megfelelő, A-gyűrűn nem szubsztituált fenil- és ferrocenilvegyületek a legtöbb esetben azonos mértékű citotoxicitással bírnak. (72. oldal) Ugyanakkor a 6 vizsgált párból felsorol 3 párt, amelyben a ferrocén származékok statisztikailag is jobb citotoxicitást mutatnak (25. táblázat), ami azt sugallja, hogy a ferrocenil származékok daganatellenes hatása jobb, mint a fenil-analógoké. Ezek alapján tervezi-e néhány A-gyűrűben szubsztituált ferrocén-tartalmú kalkon származék szintézisét (pl. a legjobb citotoxikus hatású, 4'-metoxi szubsztituált **7c** ferrocén analógjának előállítását)?
- 8.) Milyen szerkezetet takarnak a 27. táblázatban a **4c'''** és **7c'''** jelölések?
- 9.) A citotoxikus hatás egy feltételezett mechanizmusának felderítése céljából a Jelölt részletesen vizsgálta a kalkonok és karbociklusos kalkon-analógok glutationnal és *N*-acetyl-ciszteinnel (NCA) szembeni reaktivitását (5.6 fejezet). Az eredmények azonban nem igazolták a feltételezést, sőt, a várttal ellentétes módon azt találták, hogy a tiol-reaktivitás és a citotoxikus aktivitás fordított arányban áll egymással. Az eredmények egyfajta értelmezése az lehet, hogy a nagy tiol-reaktivitású vegyületek glutation-konjugációval gyorsan inaktív metabolitokká alakulnak, ez magyarázza a kisebb citotoxikus aktivitásukat. Mi a Jelölt véleménye erről az értelmezésről? Vannak-e adataik a tiol-reaktivitási vizsgálatokba bevont származékok féléletidejéről, illetve terveznek-e vizsgálatokat a féléletidő meghatározására?
- 10.) A dolgozat *Diskusszió* részében (107. oldal) a Jelölt a citotoxicitás mechanizmusával kapcsolatban így fogalmaz: „feltételezhető, hogy a **7c** és a további héttagú gyűrűs kalkon-analógok megfigyelt citotoxicitása celluláris makromolekulákkal való nem-kovalens kölcsönhatásokon alapszik.” Ezt a feltételezést megismétli az *Összefoglalás* 7. pontjában is, ám ugyanitt, a 14. pontban



már állításként fogalmazza meg, hogy a **7c** citotoxicitása celluláris makromolekulákkal való nem-kovalens kölcsönhatásokon alapszik. Mennyire megalapozott ez az állítás, és pontosan mely makromolekula/makromolekulák lehetnek a **7c** célpontjai?

Összefoglalásként megállapítom, hogy Dr. Perjési Pál a kalkonok és karbociklusos kalkon-analógok szintézise, széleskörű spektroszkópai jellemzése, szerkezet-reaktivitás és szerkezet-bioaktivitás összefüggéseinek feltárása terén nemzetközileg is kiemelkedő eredményeket ért el, és ezzel jelentős mértékben hozzájárult a tudományterület fejlődéséhez. A kalkon szerkezeti egység szubsztitúciójával, valamint különböző gyűrűtagszámú karbo- és heterociklusos analógokká történő átalakításával nagyszámú származékot állított elő, amelyek között számos, ígéretes daganatsejt-citotoxikust mutató szerkezetet azonosított; ezek az eredmények, a megismert szerkezet-hatás összefüggések birtokában további gyógyszerfejlesztési kutatások alapjául szolgálhatnak. Mindezek alapján Perjési Pál részére az MTA-doktora cím odaítélését messzemenően javaslom és támogatom.

Debrecen, 2026. augusztus 06.

Dr. Borbás Anikó
tanszékvezető egyetemi tanár
MTA doktora