

**Alternariol mikotoxin kölcsönhatásai szérum albuminnal és
ciklodextrinekkel**

Doktori (PhD) – értekezés tézisei



Dr. Fliszár-Nyúl Eszter

Gyógyszertudományok Doktori Iskola, Toxicológia program

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika

Programvezető: Prof. Dr. Pethő Gábor

Témavezető: Dr. Poór Miklós

Pécsi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszerhatástani Tanszék

Pécs, 2021.

1. Bevezetés, célkitűzések

Az alternariol (AOH) az *Alternaria* fonalas gombák által termelt, karcinogén és xenoösztrógen hatású mikotoxin, amely gyakran megtalálható szennyezőként paradicsomlében, borban és olajos magvakban. A humán szérumban albumin (HSA) a keringésben legnagyobb mennyiségben megtalálható plazmafehérje. Az endogén és exogén vegyületek albuminkötődése jelentősen befolyásolhatja azok farmako- vagy toxikokinetikai tulajdonságait. A ciklodextrinek (CD-ek) glükóz egységekből felépülő gyűrű alakú molekulák, amelyeket hidrofíliás külső részük és lipofil belső üregük alkalmassá tesz „gazda-vendég” típusú zárványkomplexek kialakítására apoláros molekulákkal (többek között mikotoxinokkal). Korábbi vizsgálatok alapján a CD technológia alkalmas lehet analitikai vizsgálatok érzékenyítésére és toxinkötő molekulák kifejlesztésére.

Kísérleteink során célul tűztük ki az AOH kölcsönhatásainak vizsgálatát albuminnal és CD-ekkel annak érdekében, hogy a mikotoxin toxikokinetikai sajátosságairól pontosabb képet kapjunk, továbbá, hogy új CD alapú mikotoxin kötő molekulákat azonosíthassunk. A kötési állandók meghatározását fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekkel végeztük. Az AOH albuminon elfoglalt kötőhelyét spektroszkópiai és ultraszűrési módszerekkel vizsgáltuk. Az AOH ciklodextrinrel képzett komplexeinek stabilitását és a fluoreszcencia erősítést savas, fiziológiás és lúgos pH-kon teszteltük. A vízben nem oldódó β -ciklodextrin gyöngypolimer toxinkötő képességét vizes oldatokban, továbbá AOH-lal szennyezett vörösbort és paradicsomlében is megvizsgáltuk.

2. Vizsgálati módszerek

Fluoreszcencia spektroszkópiai méréseinket Hitachi F-4500 fluoriméterrel végeztük 25°C-on. Az AOH-HSA komplex kötési állandóját háromféleképpen is meghatároztuk: fluoreszcencia kialszólás ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$), az AOH fluoreszcenciájának albumin-indukálta emelkedése ($\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$), valamint a HSA és az AOH közötti energia transzfer alapján ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$). Az AOH-albumin komplexek stabilitásának értékelése a Stern-Volmer egyenlet grafikus alkalmazásával és Hyperquad2006 szoftverrel történt. A mikotoxin albuminkötődésének faji eltéréseit humán, marha, sertés és patkány szérumban albuminokkal vizsgáltuk.

A site markerek hatását az AOH HSA-hoz való kötődésére szintén teszteltük. Vizsgálataink során számos Site I (furoszemid, fenilbutazon, glimepirid, indometacin), Site II (naproxen és ibuprofen), valamint hem kötőhely (metilnarancs, bilirubin, etinil-ösztadiol és tenipozid) markert

alkalmaztunk és az AOH-HSA komplex emissziós jelének változását követtük ($\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$) PBS-ben (pH 7,4).

Az AOH albuminon elfoglalt kötőhelyét ultraszűrőssel is teszteltük. Vizsgálataink során Site I (warfarin), Site II (naproxen) és hem kötőhely (S-kamptotecin) ligandumokat alkalmaztunk. A site markereket és HSA-t tartalmazó mintákat AOH nélkül, valamint 10 és 20 μM mikotoxin jelenlétében 10 kDa cut-off értékű filtereken szűrtük. A szűrletben a naproxen mennyiségét HPLC-UV, míg a warfarin és az S-kamptotecin koncentrációit HPLC-FLD módszerrel határoztuk meg.

A környezeti pH hatását az AOH natív, random metilált, valamint kvaterner-ammónium β - és γ -CD-ekkel képzett komplexeinek stabilitására és a toxin fluoreszcenciájára savas (pH 5,0), fiziológiás (pH 7,4) és lúgos (pH 10,0) pufferekben, fluoreszcencia spektroszkópiai mérésekkel teszteltük. Továbbá fiziológiás körülmények között (PBS; pH 7,4) megvizsgáltuk a szulfobutil- β -CD (SBBCD), szolubilis SBBCD polimer és a sugammadex AOH-lal kialakított komplexeinek stabilitását. A kötési állandókat a Benesi-Hildebrand egyenlet grafikus alkalmazásával határoztuk meg.

Következő kísérleteinkben AOH extrakcióját vizsgáltuk vizes oldatokból, vízben nem oldódó β -CD gyöngypolimerrel (BBP). Az AOH megkötését savas (pH 3,0 és pH 5,0), fiziológiás (pH 7,4) és lúgos (pH 10,0) körülmények között teszteltük. A mikotoxin oldatok emelkedő koncentrációjú gyöngypolimerrel, termomixerben történő inkubációját követően a BBP-t pulzuscentrifugálással eltávolítottuk, majd a felülúszó AOH tartalmát HPLC-FLD módszerrel határoztuk meg. Továbbá teszteltük az inkubációs idő és a hőmérséklet hatását is a mikotoxin extrakció kapcsán. A BBP regenerálhatóságát és újrahasznosíthatóságát az AOH kötést követően szintén megvizsgáltuk. A megkötött mikotoxint 50 v/v%-os etanolos oldattal, két egymást követő lépésben eluáltuk a BBP-ről, majd a felülúszók AOH tartalmát HPLC-FLD módszerrel határoztuk meg.

További kísérleteink során összehasonlítottuk az AOH kölcsönhatásait BCD monomerrel, szolubilis BCD polimerrel és BBP-rel. Előbbi két CD esetén a kötési állandókat fluoreszcencia spektroszkópiai méréseink alapján a Benesi-Hildebrand egyenlet grafikus alkalmazásával határoztuk meg, míg az AOH-BBP komplex stabilitását a mikotoxin szabad és kötött frakcióiból számítottuk ki. A polimer esetében a CD monomer tartalmára vonatkoztatva végeztük számolásainkat.

A BBP mikotoxin kötő képességét vörösborsban és paradicsomlében is vizsgáltuk. Az AOH-lal mesterségesen szennyezett (spike-olt) italokat emelkedő mennyiségű BBP jelenlétében inkubáltuk, majd a polimert pulzuscentrifugálással ülepítettük, és a felülúszó AOH tartalmát mintaelőkészítést követően HPLC-FLD módszerekkel határoztuk meg. A

mikotoxint a vörösborból diszperzív folyadék-folyadék mikroextrakciós technikával extraháltuk, azonban ez a módszer nem bizonyult alkalmasnak az AOH kivonására paradicsomléből. E célból új mintaelőkészítési módszert dolgoztunk ki, amely során marha szérum albumint alkalmaztunk affinitás fehérjeként az AOH extrakciójára. Továbbá teszteltük a BBP hatását a kezelt italok minőségi paramétereire; a színintenzitás és az összpolicfenol-tartalom vizsgálatát UV-Vis spektrofotometriás mérésekkel végeztük.

A BCD, szolubilis BCD polimer, SBBCD, szolubilis SBBCD polimer és sugammadex protektív hatásait az AOH celluláris toxicitásával szemben HeLa sejteken vizsgáltuk. A sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk AOH-lal CD-ek nélkül vagy azok jelenlétében. A sejtek viabilitásának változását a mért ATP szintek alapján értékeltük, amit luciferin-luciferáz reakcióval határoztunk meg.

A statisztikai értékelés IBM SPSS szoftver segítségével, one-way ANOVA módszerrel (Tukey's post-hoc teszttel) történt.

3. Eredmények és következtetések

3.1. Az AOH-albumin kölcsönhatások értékelése fluoreszcencia spektroszkópiai mérések alapján

Az AOH 345 nm gerjesztési hullámhosszon felvett emissziós spektrumában a hullámhossz maximum vörös eltolódását (421 → 455 nm) figyeltük meg HSA jelenlétében, továbbá a mikotoxin emissziós intenzitásának jelentős emelkedését tapasztaltuk, amely meghaladta a HSA és az AOH saját fluoreszcencia intenzitásainak összegét, ami AOH-HSA komplexek képződésére utal. Fluoreszcencia kioltás típusú méréseink során az AOH koncentrációfüggő módon csökkentette a HSA 340 nm-en mért emissziós intenzitását. Már kis koncentrációjú mikotoxin hatására is jelentős mértékű intenzitáscsökkenést tapasztaltunk, ami alapján az AOH kötőhelye valószínűleg az albumin 214-es pozíciójú triptofánjához (Trp-214) közel helyezkedik el. Továbbá 295 nm gerjesztési hullámhosszt alkalmazva a HSA és az AOH között energia transzfert tapasztaltunk, ami szintén a Trp-214 közelségére utal. A spektroszkópiai vizsgálatok alapján az AOH-HSA komplex kötési állandója kb. 4×10^5 L/mol.

Az AOH-albumin interakciók kapcsán a humán, marha és sertés fajok között csak kismértékű eltéréseket figyeltünk meg, azonban a patkány albuminhoz a mikotoxin kb. 8-szor erősebben kötődik, mint a másik három fajból származó albuminhoz. Ez az eltérés jelentős különbségeket okozhat a mikotoxin emberben és patkányban megfigyelhető toxikokinetikai tulajdonságaiban.

3.2. Az AOH kötőhelyének vizsgálata

Mivel HSA jelenlétében az AOH fluoreszcencia intenzitása jelentősen megnövekedett, a mikotoxin albuminról történő leszorítása a 455 nm-en mért emissziós intenzitás csökkenését eredményezi ($\lambda_{\text{ex}} = 345$ nm). Ezt figyelembe véve megvizsgáltuk a különböző site markerek hatását az AOH-HSA komplex fluoreszcenciájára. Az emissziós intenzitásban jelentős csökkenést okoztak a hem kötőhelyen másodlagos kötőhellyel rendelkező Site I markerek (indometacin és glimepirid), továbbá a hem kötőhely egyes ligandumai (bilirubin, metilnarancs és tenipozid) is nagymértékben csökkentették a mikotoxin-albumin komplex fluoreszcenciáját. Ez alapján az AOH-HSA interakció kapcsán a Site I és/vagy a hem kötőhelyek érintettségét feltételeztük.

Ultraszűrési kísérleteink során az AOH jelentősen növelte a filtrátumban a Site I ligandum warfarin koncentrációját, míg a naproxen (Site II) és az S-kamptotecin (hem kötőhely) mennyisége nem vagy csak kismértékben változott a szűrletben. A HSA nagy molekulásúlya (66,5 kDa) miatt az albumin és az albuminkötött molekulák nem jutnak át a szűrőn, ezért a warfarin koncentrációjának emelkedése a szűrletben a szabad warfarin mennyiségének emelkedését, azaz a site marker albuminról történő leszorítását jelzi.

Utóbbi megfigyelésünket spektroszkópai kísérletekkel is megerősítettük, ami során az AOH koncentrációfüggő módon csökkentette a warfarin-HSA komplex fluoreszcenciáját ($\lambda_{\text{ex}} = 317$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 379$ nm). Mivel a HSA-kötött warfarin jóval erősebb fluoreszcenciát mutat, mint a szabad fluorofór, ebből szintén az albuminról történő leszorítására következtethetünk. Megfigyeléseink tehát a Site I kötőhely közvetlen érintettségére utalnak.

3.3. A pH hatása az AOH-CD komplexek stabilitására, és a CD-ek által okozott fluoreszcencia erősítő hatások

Az AOH három fenolos hidroxilcsoporttal rendelkezik, ezek mindegyike nagyrészt protonált (nem-ionizált) formában van jelen savas kémhatású oldatokban. Azonban a pK_a értékek alapján, a vizsgált pH-tartományban (pH 5,0-10,0) a mikotoxin nem-ionizált, valamint mono- és dianion formái jelennek meg releváns mennyiségben. Az AOH natív, random-metilált és kvaterner-ammónium β - és γ -CD-ekkel kialakított kölcsönhatásainak jellemzése érdekében a mikotoxin fluoreszcencia emissziós spektrumait emelkedő CD-koncentrációk mellett vettük fel ($\lambda_{\text{ex}} = 345$ nm). Az AOH emissziós spektrumában a CD-ek jelentős vörös eltolódást idéztek elő: az

emissziós hullámhossz maximumokat 450-470 nm-en figyeltük meg az alkalmazott puffertől és CD-től függően. Savas és fiziológiás körülmények között a γ -CD (GCD) növelte meg legnagyobb mértékben az AOH fluoreszcens jelét, míg lúgos pufferben (pH 10,0) a kvaterner-ammónium- β -CD (QABCD) volt a leghatékonyabb ebből a szempontból (kb. 20-szoros fluoreszcencia erősítést eredményezve). A mikotoxin emissziós jelének jelentős változását az okozhatja, hogy az AOH-CD komplexek kialakulása során megbomlik az AOH körüli hidrátburok, ezáltal a vízmolekulák fluorpórra gyakorolt részleges kioltó hatása kisebb lesz. A megfigyelt fluoreszcencia erősítés akár analitikai módszerek érzékenyítésére is felhasználható, így analitikai szempontból is érdekes lehet.

A natív, metilált és kvaterner-ammónium-CD-ek közül pH 5,0-ön és pH 7,4-en a GCD képezte a legstabilabb komplexet AOH-lal ($K = 1,5 \times 10^3$ L/mol), míg 10,0-es pH-n a QABCD ($K = 2,5 \times 10^3$ L/mol) és a kvaterner-ammónium- γ -CD (QAGCD; $K = 3,8 \times 10^3$ L/mol) bizonyultak a legjobbnak ebből a szempontból. Az AOH a töltés nélküli CD-ekhez a savas és fiziológiás kémhatású pufferekben 3-10-szer nagyobb affinitással kötődött, mint a lúgos (pH 10,0) oldatban. Ezzel szemben az AOH-QABCD és AOH-QAGCD komplexek kötési állandóit tekintve ellenkező tendenciát figyeltünk meg. Eredményeink alapján a töltés nélküli CD-ek az AOH nem-ionizált formáját preferálják, míg a magasabb pH-kon megjelenő mono- és dianion formákkal a kationos (tetraalkil-ammónium oldallánccal rendelkező) QABCD és QAGCD képeznek stabilabb komplexeket.

További kísérleteink során megvizsgáltuk fiziológiás körülmények között a szulfobutil-szubsztituált BCD (SBBCD) származékok (monomer és szolubilis polimer), valamint a sugammadex (kémiaiilag módosított GCD) kölcsönhatásait AOH-lal. Az AOH-sugammadex komplex stabilitásai kiemelkedően magasnak bizonyult ($K = 2,9 \times 10^4$ L/mol).

3.4. AOH kölcsönhatásainak összehasonlítása BCD monomer, szolubilis BCD-polimer és BBP kapcsán

Habár a BCD monomer viszonylag alacsony affinitással kötődik AOH-hoz, kísérleteink alapján a szolubilis BCD polimer és a BBP (a moláris monomer tartalmuk alapján számítva) tízszer erősebben mikotoxinkötőnek bizonyultak, mint a BCD. Ez valószínűleg a CD egységek között fellépő ún. kooperatív/potenciórozó hatásokkal magyarázható.

3.5. AOH extrakciója vizes oldatokból BBP-rel

Az AOH vizes oldatokból β -CD gyöngypolimerrel (BBP) történő eltávolítását pH 3,0-10,0 közötti tartományban teszteltük. Az inkubációt és a mikotoxin felülúszóból történő meghatározását követően megállapítottuk, hogy pH 3,0-7,4 között a BBP jó toxinkötőnek bizonyult: a legmagasabb, 20 mg/1,5 mL koncentrációban a toxin közel teljes mennyiségét eltávolította a felülúszóból. Ezzel szemben pH 10,0-en a polimer csökkent toxinkötő képességét figyeltük meg, a BBP a legmagasabb alkalmazott mennyiségben is mindössze kb. 60%-kal csökkentette az AOH koncentrációját az oldatban. A hőmérséklet és az inkubációs idő hatásait is megvizsgáltuk. A mikotoxin extrakciója nem mutatott jelentős hőmérsékletfüggést 20-40°C tartományban. Azonban az inkubációs idő hosszával nagymértékben változik a toxinkötés eredményessége: a maximális kötődés eléréséhez legalább 30 perces inkubáció szükséges. Továbbá sikerrel regeneráltuk a BBP-t az AOH vizes oldatból történő eltávolítását követően 50 v/v%-os etanol-víz eleggyel (két lépésben), ami gyakorlatilag a megkötött mikotoxin teljes mennyiségét eluálta a polimerről. A regenerált BBP AOH kötő képessége három egymást követő inkubációs cikluson keresztül változatlan maradt.

3.6. AOH extrakciója vörösborból BBP-rel

Az AOH eltávolítását vörösborból emelkedő koncentrációjú BBP jelenlétében teszteltük. Az inkubációt követően a mintákban maradó AOH-t mintaelőkészítés után kvantifikáltuk (HPLC-FLD). Méréseink alapján a BBP koncentrációfüggő módon csökkentette a vörösborban az AOH mennyiségét, a legmagasabb alkalmazott BBP koncentráció (25 mg/1,5 mL) az AOH 80%-át eltávolította. A BBP azonban csökkentette a vörösbor színintenzitását és összpolicifenol-tartalmát, igaz relatíve jóval kisebb mértékben, mint az AOH mennyiségét.

3.7. AOH extrakciója paradicsomléből BBP-rel

Az AOH paradicsomléből történő extrakcióját BBP-rel, emelkedő mennyiségű gyöngypolimer jelenlétében vizsgáltuk. Az inkubáció után a visszamaradó AOH-t a minták felülúszójából marha albuminnal extraháltuk, amelyet affinitás fehérjeként használtunk, majd a toxin mennyiségét HPLC-FLD módszerrel határoztuk meg. A BBP koncentrációfüggő módon csökkentette az AOH koncentrációját paradicsomlében, 25 mg/1,5 mL BBP kb. 55%-os csökkenést okozott a mikotoxin tartalomban. A BBP a paradicsomlé színintenzitását még a legmagasabb koncentrációban sem

befolyásolta, azonban az összpolicfenol-tartalom relatív csökkenése (46%) az AOH extrakciójával összemérhető volt.

3.8. A CD-ek protektív hatása az AOH toxicitásával szemben HeLa sejteken

Munkánk során *in vitro* sejt kísérletekben vizsgáltam, hogy a natív BCD, a szolubilis BCD polimer, a SBBCD, a szolubilis SBBCD polimer és a sugammadex képesek-e befolyásolni az AOH által okozott viabilitás csökkenést. A natív BCD még a legmagasabb (a toxinhoz viszonyított több, mint 20-szoros) koncentrációban sem fejtett ki protektív hatást az AOH toxicitásával szemben, továbbá a szolubilis BCD, SBBCD és szolubilis SBBCD polimer is csak alig javították a sejtek életképességét. Ezzel szemben a sugammadex már az AOH-hoz viszonyítva 5-szörös koncentrációban is csaknem teljesen megszüntette a mikotoxin által okozott viabilitás csökkenést.

4. Összefoglalás, új megállapítások

Az AOH *Alternaria* fajok által termelt mikotoxin, amely gyakran előfordul szennyezőként paradicsomban, különféle gyümölcsökben, olajos magvakban és feldolgozott termékeikben (borban, paradicsomlében, növényi olajokban, stb.). Az AOH-lal történő expozíció hosszútávú következményei között szerepelnek karcinogén és endokrin diszruptor hatásai. Habár az AOH-t vizsgálták *in vivo* modellekben, plazmafehérje-kötődéséről a szakirodalom nem számol be. Ennek ismerete nagy jelentőséggel bírhat a mikotoxin toxikokinetikájának pontosabb megismerése és megértése kapcsán, beleértve a fajok közötti eltéréseket is. Továbbá a toxin káros hatásainak kivédése céljából fontos az élelmiszerek mikotoxin-tartalmának monitorozására alkalmas, megfelelő érzékenységgű analitikai módszerek kifejlesztése, valamint új dekontaminációs stratégiák kidolgozása. Utóbbiak kapcsán, a ciklodextrin (CD) technológia ígéretesnek tűnik. A PhD munkámhoz kapcsolódó új megállapítások a következők:

- Az AOH stabil komplexet alakít ki humán szérum albuminnal, kötési állandója ($\log K = 5,6$) hasonlóan magas, mint az orális antikoaguláns warfariné, így plazmafehérjekötődése toxikokinetikai szempontból jelentősnek tűnik.
- Az AOH a Sudlow's site I kötőhelyet foglalja el a HSA-on, a warfarint koncentrációfüggő módon képes leszorítani albuminról.
- Az AOH marha és sertés albuminhoz hasonló affinitással kötődik, mint HSA-hoz, míg a patkány albuminnal kialakított komplex stabilitása kb. 8-szor magasabb.
- A marha szérum albumint affinitás fehérjeként felhasználva sikeresen kidolgoztunk egy mintaelőkészítési módszert az AOH extrakciójára vizes oldatból és paradicsomléből.
- Az AOH-CD komplexek stabilitása függ a környezeti pH-tól és az alkalmazott CD típusától. Az elsőként megvizsgált CD-ek (natív, metil- és kavterner-ammónium- β - és γ -CD-ek) közül savas (pH 5,0) és fiziológiás kémhatású pufferben a GCD, míg lúgos közegben (pH 10,0) a QABCD és a QAGCD alakították ki a legstabilabb ($K \sim 10^3$ L/mol) komplexeket a mikotoxinnal. Az AOH fluoreszcenciáját legnagyobb mértékben a QABCD erősítte pH 10,0-en (kb. 20-szorosára). 5,0-ös és 7,4-es pH-n a GCD bizonyult leghatékonyabbnak ebből a szempontból (kb. 10-szeres erősítéssel).

- A BBP hatékony toxinkötőnek bizonyult vizes oldatokban, azonban pH 10,0-en az alacsonyabb pH-jú pufferekhez viszonyítva kisebb mértékben csökkentette a minták AOH tartalmát.
- A BBP 50 v/v%-os etanol oldattal regenerálható az AOH megkötését követően, és a megkötött toxin elúciója után ismét felhasználható.
- A BBP spike-olt vörösborban és paradicsomlében is csökkentette az AOH mennyiségét, azonban utóbbiban kb. 30%-kal kisebb mértékű toxinkötést tapasztaltunk. A vörösbor színintenzitása és összpolicifol-tartalma is csökkent a BBP-rel történő kezelést követően, ugyanakkor a minőségi változás relatív mértéke lényegesen kisebb volt az AOH relatív koncentrációcsökkenéséhez viszonyítva. A BBP a paradicsomlé színminőségét nem befolyásolta, azonban az összpolicifol-tartalmát közel hasonló mértékben csökkentette, mint az AOH relatív mennyiségét.
- A BCD monomerrel összehasonlítva, a szolubilis BCD polimer és a BBP (monomer tartalmuk alapján) jóval stabilabb komplexeket alakított ki AOH-lal.
- Fiziológias körülmények között a sugammadex a többi tesztelt CD-hez képest kiemelkedően magas stabilitású komplexet képez AOH-lal. Továbbá a sugammadex HeLa sejtekben a mikotoxinhoz viszonyított kb. 5-szörös koncentrációban szinte teljes mértékben képes volt kivédeni az AOH által indukált toxicitást. Ezzel szemben a BCD monomer egyáltalán nem, míg a szolubilis BCD polimer, a SBBCD és a szolubilis SBBCD polimer csak kismértékben fejtettek ki protektív hatást az AOH toxicitásával szemben.

5. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Poór Miklósnak a munkám során nyújtott szakmai segítségéért és a szakmai és emberi tekintetben is példamutató témavezetői hozzáállásáért. Köszönöm Prof. Dr. Pethő Gábornak, a Gyógyszerhatástani Tanszék vezetőjének, hogy a Tanszéken dolgozhatok, és munkám során értékes szakmai tapasztalatokkal és kapcsolatokkal gazdagodhatok. Szeretném megköszönni kolléganőimnek, Dr. Faisal Zelmának és Dr. Mohos Violetának az ultraszűrési és a sejtekkel folytatott kísérletek során nyújtott segítségüket, és azt, hogy a mindennapi munka során is mindig számíthatok rájuk; továbbá minden volt és jelenlegi munkatársamnak köszönöm a rengeteg szakmai és emberi támogatást. TDK-hallgatómnak, Szabó Ákosnak köszönöm a ciklodextrinekkel végzett fluoreszcencia spektroszkópiai kísérletekben és a gyöngypolimerrel történő toxin-extrakció során végzett lelkiismeretes munkáját. Dr. Kunsági-Máté Sándornak és Dr. Lemli Beátának szeretném megköszönni a Hyperquad2006 szoftverrel történő számítások elvégzését. Köszönettel tartozom Dr. Sente Lajosnak, a CycloLab Kft. munkatársának, amiért a kísérleteinkben használt ciklodextrineket rendelkezésünkre bocsátotta, és értékes szakmai tanácsokkal szolgált számunkra. Továbbá szeretném megköszönni Schweibert Istvánnak, Dr. Almásiné Rubint Eszternek, Lukácsné Götz Zsuzsannának és Fábíán Katalinnak a laboratóriumi munkám során nyújtott értékes segítségüket. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak és barátaimnak azt a támogatást és szeretetet, amellyel végigkísértek ezen az úton.

6. Saját közlemények listája

6.1. Jelen dolgozat alapjául szolgáló folyóiratcikkek:

Fliszár-Nyúl E, Lemli B, Kunsági-Máté S, Dellafiora L, Dall'Asta C, Cruciani G, Pethő G, Poór M, Interaction of Mycotoxin Alternariol with Serum Albumin. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 20. (2019) 2352. [IF = 4,556]

Fliszár-Nyúl E, Lemli B, Kunsági-Máté S, Sente L, Poór M, Interactions of Mycotoxin Alternariol with Cyclodextrins and its Removal from Aqueous Solution by Beta-Cyclodextrin Bead Polymer. BIOMOLECULES 9. (2019) 428. [IF = 4,082]

Fliszár-Nyúl E, Szabó Á, Sente L, Poór M, Extraction of mycotoxin alternariol from red wine and from tomato juice with beta-cyclodextrin bead polymer. JOURNAL OF MOLECULAR LIQUIDS 319. (2020) 114180. [IF = 5,065]

A dolgozat alapjául szolgáló cikkek összesített impakt faktora: 13,703

Kumulatív impakt faktor: 76,080

Független hivatkozások: 46

6.2. Jelen dolgozat alapjául szolgáló egyéb közlemények:

Fliszár-Nyúl E, Szabó Á, Lemli B, Kunsági-Máté S, Poór M, Interactions of Mycotoxin Alternariol with Serum Albumin and Cyclodextrins. **4th Symposium on Weak Molecular Interactions** (Matsue, Japan, 2019.05.17.-2019.05.19.) [előadás]

Fliszár-Nyúl E, Szabó Á, Lemli B, Sente L, Poór M, Alternariol mikotxin kölcsönhatásai szérum albuminnal és ciklodextrinekkel. **TOX'2019** (Szeged, Magyarország, 2019.10.09.-2019.10.11.) [poszter]

Poór M, Szabó Á, **Fliszár-Nyúl E**, Interaction of alternariol with human serum albumin and cyclodextrins. **41st Mycotoxin Workshop** (Lisszabon, Portugália, 2019.05.06.-2019.05.08.) [poszter]

6.2. Egyéb folyóiratcikkek:

Nyúl E, Kuzma M, Mayer M, Lakatos S, Almási A, Perjési P, HPLC study on Fenton-reaction initiated oxidation of salicylic acid. Biological relevance of the reaction in intestinal biotransformation of salicylic acid. FREE RADICAL RESEARCH 52. (2018) 1040–1051. [IF = 2,836]

Fliszár-Nyúl E, Mohos V, Bencsik T, Lemli B, Kunsági-Máté S, Poór M, Interactions of 7,8-Dihydroxyflavone with Serum Albumin as well as with CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, and Xanthine Oxidase Biotransformation Enzymes. BIOMOLECULES 9. (2019) 655. [IF = 4,082]

Fliszár-Nyúl E, Mohos V, Csepregi R, Mladěnka P, Poór M, Inhibitory effects of polyphenols and their colonic metabolites on CYP2D6 enzyme using two different substrates. BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY 131. (2020) 110732. [IF = 4,545]

Kuzma M, Nyúl E, Mayer M, Fischer E, Perjési P, HPLC analysis of in vivo intestinal absorption and oxidative metabolism of salicylic acid in the rat. BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY 30. (2016) 2044–2052. [IF = 1,613]

Mohos V, Bencsik T, Boda G, Fliszár-Nyúl E, Lemli B, Kunsági-Máté S, Poór M, Interactions of casticin, ipriflavone, and resveratrol with serum albumin and their inhibitory effects on CYP2C9 and CYP3A4 enzymes. BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY, 107. (2018) 777–784. [IF = 3,457]

Mohos V, Fliszár-Nyúl E, Schilli G, Hetényi C, Lemli B, Kunsági-Máté S, Bognár B, Poór M, Interaction of Chrysin and Its Main Conjugated Metabolites Chrysin-7-Sulfate and Chrysin-7-Glucuronide with Serum Albumin. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 19. (2018) 4073. [IF = 3,687]

Mohos V, Pánovics A, Fliszár-Nyúl E, Schilli G, Hetényi C, Mladěnka P, Needs PW, Kroon PA, Pethő G, Poór M, Inhibitory Effects of Quercetin and Its Human and Microbial Metabolites on Xanthine Oxidase Enzyme. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 20. (2019) 2681. [IF = 4,556]

Faisal Z, **Fliszár-Nyúl E**, Dellaflora L, Galaverna G, Dall'Asta C, Lemli B, Kunsági-Máté S, Szente L, Poór M, Cyclodextrins Can Entrap Zearalenone-14-Glucoside: Interaction of the Masked Mycotoxin with Cyclodextrins and Cyclodextrin Bead Polymer. *BIOMOLECULES* 9. (2019) 354. [IF = 4,082]

Faisal Z, Garai E, Csepregi R, Bakos K, **Fliszár-Nyúl E**, Szente L, Balázs A, Cserhádi M, Kőszegi T, Urbányi B, Csenki Z, Poór M, Protective effects of beta-cyclodextrins vs. zearalenone-induced toxicity in HeLa cells and Tg(vtg1:mCherry) zebrafish embryos. *CHEMOSPHERE* 240. (2020) 124948. [IF = 5,778]

Faisal Z, Vörös V, **Fliszár-Nyúl E**, Lemli B, Kunsági-Máté S, Poór M, Interactions of zearalenone, α -zearalanol, β -zearalanol, zearalenone-14-sulfate, and zearalenone-14-glucoside with serum albumin. *MYCOTOXIN RESEARCH* 36. (2020) 389–397. [IF = 3,164]

Faisal Z, Vörös V, **Fliszár-Nyúl E**, Lemli B, Kunsági-Máté S, Csepregi R, Kőszegi T, Zsila F, Poór M, Probing the Interactions of Ochratoxin B, Ochratoxin C, Patulin, Deoxynivalenol, and T-2 Toxin with Human Serum Albumin. *TOXINS* 12. (2020) 392. [IF = 3,531]

Mohos V, **Fliszár-Nyúl E**, Ungvári O, Kuffa K, Needs PW, Kroon PA, Telbisz Á, Özvegy-Laczka C, Poór M, Inhibitory Effects of Quercetin and Its Main Methyl, Sulfate, and Glucuronic Acid Conjugates on Cytochrome P450 Enzymes, and on OATP, BCRP and MRP2 Transporters. *NUTRIENTS* 12. (2020) 2306–20321. [IF = 4,546]

Mohos V, **Fliszár-Nyúl E**, Ungvári O, Bakos É, Kuffa K, Bencsik T, Zsidó BZ, Hetényi C, Telbisz Á, Özvegy-Laczka C, Poór M, Effects of chrysin and its major conjugated metabolites chrysin-7-sulfate and chrysin-7-glucuronide on cytochrome P450 enzymes, and on OATP, P-gp, BCRP and MRP2 transporters. *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION* 48. (2020) 1064–1073. [IF = 3,306]

Mohos V, **Fliszár-Nyúl E**, Poór M, Inhibition of Xanthine Oxidase-Catalyzed Xanthine and 6-Mercaptopurine Oxidation by Flavonoid Aglycones and Some of Their Conjugates *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES* 21 (2020) 3256. [IF = 4,556]

Mohos V, **Fliszár-Nyúl E**, Lemli B, Zsidó BZ, Hetényi C, Mladěnka P, Horký P, Pour M, Poór M, Testing the Pharmacokinetic Interactions of 24 Colonic Flavonoid Metabolites with Human Serum Albumin and Cytochrome P450 Enzymes *BIOMOLECULES* 10 (2020) 409. [IF = **4,082**]

Zsidó BZ, Balog M, Erős N, Poór M, Mohos V, **Fliszár-Nyúl E**, Hetényi C, Masaki N, Hideg K, Kálai T, Bognár B, Synthesis of Spin-Labelled Bergamottin: A Potent CYP3A4 Inhibitor with Antiproliferative Activity. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES* 21. (2020) 508. [IF = **4,556**]

6.3. Egyéb közlemények:

Nyúl E, Kuzma M, Perjési P, Szalicilátok vékonybél metabolizmusának vizsgálata HPLC módszerrel. **XV. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus** (Budapest, Magyarország, 2014.04.10.-2014.04.12.) [poszter]

Nyúl E, Kuzma M, Mayer M, Perjési P, Incubation time-, pH- and reagent ratio dependence of the product distribution in the Fenton reaction of salicylic acid. **7th BBBB** (Balatonfüred, Magyarország, 2017.10.05.-2017.10.07.) [poszter]

Fliszár-Nyúl E, Almási A, Papp R, Garai K, Kvell Krisztian, Kuzma M, Mózsik G, Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin metabolism of the small intestine in the diabetic rat by HPLC-FLD. **4th International Cholnoky Symposium** (Pécs, Magyarország, 2018.05.10.-2018.05.11.) [előadás]

Fliszár-Nyúl E, Mohos V, Poór M, Interactions of 7,8-dihydroxyflavone with human serum albumin as well as with CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, and xanthine oxidase biotransformation enzymes. **5th International Cholnoky Symposium** (Pécs, Magyarország, 2019.04.25.) [előadás]

Fliszár-Nyúl E, Mohos V, Poór M, “A 7,8-dihidroxiflavin kölcsönhatásainak vizsgálata humán szérum albuminnal, valamint CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 és xantin-oxidáz biotranszformációs enzimekkel. **Farmakokinetika és Gyógyszermetabolizmus Szimpózium** (Galyatető, Magyarország, 2019.04.10.-2019.04.12.) [poszter]

Fliszár-Nyúl E, Mohos V, Poór M, Interactions of 7,8-dihydroxyflavone with serum albumin and biotransformation enzymes. 13th World Congress on Polyphenols Applications (Valletta, Málta, 2019.09.30.-2019.10.01.) [poszter]

Mohos V, Pánovics A, **Fliszár-Nyúl E**, Moravcova M, Mladenka P, Poór M, A colon mikroflóra által képzett quercetin metabolitok kölcsönhatásainak vizsgálata szérumban, valamint xantin-oxidáz és CYP2C9 biotranszformációs enzimekkel. **Farmakokinetika és Gyógyszermetabolizmus Szimpózium** (Gályatető, Magyarország, 2019.04.10.-2019.04.12.) [poszter]

Poór M, Pánovics A, Mohos V, Vida R, Fittler A, **Fliszár-Nyúl E**, Quercetin tartalmú étrend-kiegészítők potenciális farmakokinetikai kölcsönhatásainak in vitro vizsgálata. **Farmakokinetika és Gyógyszermetabolizmus Szimpózium** (Gályatető, Magyarország, 2019.04.10.-2019.04.12.) [poszter]

Mohos V, **Fliszár-Nyúl E**, Bencsik T, Bognár B, Poór M, Interactions of Chrysin Conjugates with Cytochrome P450 Enzymes. **13th World Congress on Polyphenols Applications** (Valletta, Málta, 2019.09.30.-2019.10.01.) [poszter]

Poór M, Mohos V, **Fliszár-Nyúl E**, Interactions of Conjugated and Colon Metabolites of Flavonoids with Serum Albumin and Biotransformation Enzymes. **13th World Congress on Polyphenols Applications** (Valletta, Málta, 2019.09.30.-2019.10.01.) [előadás]

Poór M, Faisal Z, **Fliszár-Nyúl E**, Mikotoxin-albumin kölcsönhatások vizsgálata és jelentőségük. **TOX'2019** (Szeged, Magyarország, 2019.10.09.-2019.10.11.) [előadás]

Faisal Z, **Fliszár-Nyúl E**, Dellafiora L, Galaverna G, Dall'Asta C, Sente L, Poór M, "Zearalenon-14-glükózid interakcióinak vizsgálata ciklodextrinrel és béta-ciklodextrin gyöngypolimerrel - vajon a ciklodextrinek kölcsönhatásba lépnek a maszkolt mikotoxinnal? **TOX'2019** (Szeged, Magyarország, 2019.10.09.-2019.10.11.) [előadás]

Mohos V, Pánovics A, **Fliszár-Nyúl E**, Poór M, Quercetin és chrysin konjugált metabolitjaik kölcsönhatásai xantin-oxidáz enzimmel. **TOX'2019** (Szeged, Magyarország, 2019.10.09.-2019.10.11.) [poszter]

Poór M, Pánovics A, Mohos V, **Fliszár-Nyúl E**, Moravcova M, Mladenka P, Bencsik T, Inhibition of Xanthine Oxidase Enzyme by Human and Microbial Metabolites of Quercetin. **12th World Congress on Polyphenols Applications** (Bonn, Németország, 2018.09.26.-2018.09.28.) [poszter]

Mohos V, Pánovics A, **Fliszár-Nyúl E**, Moravcova M, Mladenka P, Needs PW, Kroon PA, Poór M, Interaction of human and microbial metabolites of quercetin with serum albumin and biotransformation enzymes. **5th International Chohnoky Symposium** (Pécs, Magyarország, 2019.04.25.) [előadás]

Poór M, **Fliszár-Nyúl E**, Mohos V, Faisal Z, Lemli B, Pharmacological/toxicological importance of albumin-ligand interactions. **5th International Chohnoky Symposium** (Pécs, Magyarország, 2019.04.25.) [előadás]

Poór M, **Fliszár-Nyúl E**, Mohos V, Faisal Z, Lemli B, Hetényi C, Kunsági-Máté S, Pharmacological/Toxicological Importance and Investigation of Albumin-Ligand Interactions. **4th Symposium on Weak Molecular Interactions** (Matsue, Japán, 2019.05.17.-2019.05.19.) [előadás]

Mohos V, Pánovics A, **Fliszár-Nyúl E**, Moravcova M, Mladenka P, Needs PW, Kroon PA, Poór M, Interactions of Human and Microbial Metabolites of Quercetin with Serum Albumin and Biotransformation Enzymes. **4th Symposium on Weak Molecular Interactions** (Matsue, Japán, 2019.05.17.-2019.05.19.) [előadás]

Perjési P, Almási A, Kenari F, Kuzma M, **Nyúl E**, Non-enzyme catalyzed metabolic transformations of xenobiotics. **7th BBBB** (Balatonfüred, Magyarország, 2017.10.05.-2017.10.07.) [előadás]

Schaeffler M, Poór M, **Fliszár-Nyúl E**, Faisal Z, Benkovics G, Sohajda T, Szenté L, Cyclodextrin-enabled detoxifications. **10th Annual world ADC** (San Diego, CA, USA, 2019. 10.08-2019.10.11.) [poszter]

Poór M, Mohos V, **Fliszár-Nyúl E**, Interactions of flavonoid metabolites with serum albumin and biotransformation enzymes. **XVI. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus** (2020.09.10.-2020.09.12.) [előadás]