

A metotrexát és egyes analagonjainak másodlagos kölcsönhatásai és antioxidáns tulajdonságai

Doktori (PhD) értekezés tézisei



Dr. Preisz Zsolt

Gyógyszertudományok Doktori Iskola, Gyógyszerészi kémia program

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika

Programvezető: Prof. Dr. Perjési Pál

Témavezető: Dr. Kunsági-Máté Sándor

Pécsi Tudományegyetem

Gyógyszerésztudományi Kar

Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet

Pécs, 2022

1. Bevezetés

A metotrexát (MTX) egy évtizedek óta ismert, széleskörűen alkalmazott reuma- és daganatellenes gyógyszerhatóanyag. Fényérzékeny vegyület, ultraibolya (UV) fény hatására keletkező bomlástermékeiről azonban kevés adat áll rendelkezésre. Humán szérum albuminnal (HSA) való másodlagos kölcsönhatását leírták, de nem ismert, hogy a MTX, illetve bomlástermékei hogyan befolyásolják ezen fehérje stabilitását, ezért kutatásunk egyik célja ennek leírása volt.

A MTX számos mellékhatást okozhat, melyek jelenleg a klinikai gyakorlatban csak korlátozottan védhetők ki. A modern gyógyszerterápia egyik legfontosabb célja, hogy a szervezetbe juttatott hatóanyagok célzottan, csak a kezelendő szervekben vagy szövetekben fejtsék ki hatásukat, és ezáltal csökkenjen a mellékhatások száma és tüneteik súlyossága. Kettő ígéretes módszert vizsgáltunk meg, melyek elősegíthetik, hogy a MTX esetében ez a cél közelebb kerüljön: a fotofarmakológiai átalakítást és a befogadó-vendég (host-guest) típusú komplexbe helyezést.

A fotofarmakológia egy új tudományterület, melynek célja olyan vegyületek létrehozása, melyek fény hatására konformációváltozást szenvednek, így működésük megváltozik. A MTX-nak néhány évvel ezelőtt létrehozták fotofarmakológiai származékát (Phototrexate, PHX), utóbbi vegyület különböző tulajdonságait hasonlítottuk össze az anyavegyülettel.

A rezorcinarén alapú kavitandok kehely alakú, gyűrűs szerkezetű befogadó molekulák. Az alapvázhoz kapcsolódó molekularészek jelentősen befolyásolhatják, hogy az adott kavitand milyen molekulákat képes komplexálni, illetve hogy a létrejövő másodlagos kölcsönhatás milyen erős lesz. Ezért a kavitandok alkalmasak lehetnek gyógyszer szállító rendszerek tervezésére. MTX-tal, illetve PHX-tal való kölcsönhatásukról eddig nem állt rendelkezésre információ, ezért ezzel kapcsolatos kutatásokat is végeztünk.

Mivel a kardiovaszkuláris betegségek is krónikus szisztémás gyulladásoknak tekinthetők, az elmúlt évtizedben a gyulladáscsökkentő hatóanyagok kardioprotektív hatásával foglalkozó vizsgálatok egyre nagyobb hangsúlyt kaptak. A MTX és a PHX esetében is indokoltak lehetnek ezek a kutatások, ezért összehasonlítottuk ezen vegyületeket és a PHX-ra vonatkozóan elsőként mutattunk ki antioxidatív hatást.

2. Célkitűzések

A MTX egy évtizedek óta ismert molekula, azonban fehérjékkel és befogadó molekulákkal való másodlagos kölcsönhatásairól viszonylag kevés adat áll rendelkezésre. Fotodegradációs termékeinek (a DFP-nek és az ABGA-nak), illetve fotofarmakológiai származékának (a PHX-nak) fizikai-kémiai tulajdonságai és kölcsönhatásai pedig szinte teljesen felderítetlen területek. Ezért munkám során a következő célokat tűztem ki:

- A HSA MTX-tal, illetve annak fotodegradációs termékeivel való kölcsönhatásának termodinamikai jellemzése, valamint annak vizsgálata, hogy ezek a kölcsönhatások milyen hatással vannak a fehérje stabilitására.
- A MTX és PHX kavitandszármazékokkal való kölcsönhatásának termodinamikai jellemzése.
- A MTX és PHX antioxidatív tulajdonságainak vizsgálata és összehasonlítása több különböző módszer alkalmazásával.

3. Vizsgálati módszerek

A fluorimetriás méréseket Fluorolog $\tau 3$ spektrofluoriméterrel (Jobin-Yvon/Spex, Longjumeau, Franciaország) végeztük. A monokromátorokon a gerjesztési, illetve az emissziós oldalon a sávszélességet 5.25-5.25 nm-re állítottuk, valamint merőleges gerjesztési-megfigyelési elrendezést alkalmaztunk. A mérésekhez 1 cm optikai úthosszal rendelkező, zárható kvarc küvettákat használtunk.

A MTX fotodegradációs termékeinek (DFP, ABGA) előállítását, illetve a fotodegradáció folyamatának időbeli nyomon követését fluoriméterrel végeztük ($\lambda_{\text{ex}} = 302$ nm) szobahőmérsékleten. A MTX koncentrációja 1 mM volt, pH 7,4-es phosphate buffered saline-ban (PBS).

Fluorimetriás módszerrel vizsgáltuk a MTX-nak és fotodegradációs termékeinek HSA-nal való kölcsönhatását ($\lambda_{\text{ex}} = 371$ nm) PBS-ben (pH 7,4). A mintákban a HSA koncentrációja állandó (1 μM), a többi reagensé pedig változó volt (0-450 μM), és minden minta emisszióját megmértük 288 K, 293 K, 298 K, 303 K és 308 K hőmérsékleteken. A Benesi-Hildebrand és a van 't Hoff egyenletek segítségével meghatároztuk a kölcsönhatások kötési állandóit és termodinamikai paramétereit. A HSA

hődenaturációjának kinetikáját differenciál pásztázó kalorimetriás módszerrel (μ SC, Setaram, Lyon, Franciaország) mértük, különböző felfűtési sebességek alkalmazásával, a Kissinger egyenlet segítségével. Megvizsgáltuk, hogy a MTX és fotodegradációs termékei milyen hatással vannak a HSA hődenaturációjára. Az adatok kiértékelését Calisto Thermal Analysis Software (Setaram Instrumentation, Lyon, Franciaország) programmal végeztük.

A *transz*-PHX izomerizációját UV-besugárzással végeztük ($\lambda=366$ nm), melyhez egy Fluotest UV-lámpát használtunk (Original Hanau, Hanau, Németország). Az izomerizációs folyamat nyomon követése céljából a bevilágítás során percenként regisztráltuk a minták abszorpciós spektrumait, amíg az izomerizáció teljes mértékben le nem játszódott. Az UV-Vis abszorpciós spektrumokat Specord Plus 210 (Analytik Jena, Jéna, Németország) spektrofotométerrel regisztráltuk, kivéve az ABTS esszék esetén, melyekhez Specord 40 (Analytik Jena, Jéna, Németország) spektrofotométert használtunk.

Szintén fluoriméterrel vizsgáltuk a MTX-tetrakis(androster-4-en-3-on-17 α -etinil)-kavitand (TAC), *transz*-PHX-TAC, *transz*-PHX-tetrakis(3,5-dikarboxilátófenoxi)-kavitand (TDC), *cisz*-PHX-TAC és *cisz*-PHX-TDC kölcsönhatások kötési állandóit és termodinamikai paramétereit. Az oldószer dimetil-szulfoxid (DMSO) volt, a MTX esetében 390 nm-es, a PHX esetében pedig 366-nm-es λ_{ex} -t alkalmaztunk. Minden esetben a MTX (10 μ M), illetve PHX (50 μ M) koncentrációja volt állandó, a kavitandszármazékoké pedig változó (a MTX esetében 0-80 μ M, a PHX esetében pedig 0-450 μ M). Az emissziós spektrumokat többféle hőmérsékleten is felvettük. A Benesi-Hildebrand és van 't Hoff egyenletekkel kiszámoltuk a komplexek kötési állandóit és a képződésük termodinamikai paramétereit.

Xantin-oxidáz (XO) esszét alkalmaztunk hipoxantin (HX) szubsztráttal abból a célból, hogy összehasonlítsuk a MTX és PHX szuperoxid gyökfogó tulajdonságát. Ehhez elektron paramágneses rezonancia (EPR) spektroszkópiai méréseket végeztünk MiniScope MS 200 (Magnettech, Berlin, Németország) műszerrel, az adatok kiértékeléséhez pedig MiniScopeCtrl programot használtunk. Oldószerként Krebs-HEPES EPR puffert alkalmaztunk, a spincsapda pedig 1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidin-4-ol (N-hidroxi-TEMPOL) volt. A minták 10 mU/ml XO-t, 20 μ M HX-t, 100 μ M N-hidroxi-TEMPOL-t, valamint változó koncentrációjú MTX-ot (0-5 mM), illetve *transz*- vagy *cisz*-PHX-ot (0-2 mM) tartalmaztak. Csak N-hidroxi-TEMPOL-t, illetve csak XO-t és HX-t tartalmazó mintákat is mértünk kontrollként. Az oldatokból óránként

vettünk mintát, közben az oldatokat 37°C-on tartottuk. Az EPR jelek amplitudóinak időbeli változásából meghatároztuk a gyöktermelés sebességi együtthatóit.

ABTS esszével összehasonlítottuk a MTX és a PHX Trolox ekvivalens antioxidáns kapacitás (TEAC) értékeit. A törzsoldatban a 2,2'-azino-bisz-3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav kation gyök ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) koncentrációja 2,45 mM volt. Ezt úgy hígítottuk az oldószerrel (PBS), hogy 0,70-es abszorbancia értéket kapjunk 734 nm-en, 37 °C-on. MTX-, *transz*-PHX-, *cisz*-PHX-, illetve Trolox-oldatokat adtunk hozzá, a különböző mintákban ezen anyagok koncentrációját változtattuk (2,5 μM , 7,5 μM , 10 μM , 12,5 μM). Mérés előtt a mintákat 6 percig 37 °C-on inkubáltuk.

A kavitandók MTX-tal és PHX-tal alkotott komplexei képződésének termodinamikai paramétereit számítógépes szoftver segítségével is meghatároztuk. Ehhez a HyperChem 8.0 programot használtuk (Hypercube Inc., Gainesville, FL, USA). Mivel ezen modellezésnek tájékozódó jelleget szántunk, az egyensúlyi konformációkat, valamint az entrópia meghatározásához szükséges rezgési-rotációs analízist is szemiempirikus AM1 módszerrel végeztük.

A statisztikai értékelések one-way analysis of variance (ANOVA) tesztetel történtek, OriginLab 8.1 program használatával (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA; $p < 0,05$).

4. Eredmények, következtetések

4.1. MTX-nak és fotodegradációs termékeinek HSA-nal való kölcsönhatása

A MTX fotodegradációs termékeit úgy állítottuk elő, hogy 1 mM koncentrációjú MTX oldatot megvilágítottunk UV-fénnyel ($\lambda_{\text{ex}}=302$ nm). A bevilágítás következtében egyre nagyobb mennyiségben megjelenő bomlástermékek fluoreszcenciája miatt egy széles emissziós sáv jelent meg 458 nm-es maximummal, ezt használtuk a reakció nyomon követéséhez. Mikor az emissziós csúcs intenzitása már nem növekedett tovább (kb. 4000 percnyi megvilágítás után), arra következtettünk, hogy a MTX lebomlott, és már csak DFP és ABGA van jelen az oldatban.

Fluorimetriás módszerrel, a Benesi-Hildebrand egyenlet és a van 't Hoff egyenlet segítségével megvizsgáltuk a HSA kölcsönhatását MTX-tal, illetve a MTX fotodegradációs termékeivel ($\lambda_{\text{ex}}=371$ nm). A 455 nm-es emissziós csúcsot figyelembe véve kiszámoltuk a kölcsönhatások kötési állandóit, és meghatároztuk a termodinamikai

paramétereiket. A kiszámolt kötési állandók arra utalnak, hogy a mérések hőmérséklettartományában mind a MTX-ot, mind fotodegradációs termékeit stabilan köti a HSA, és a kötések erőssége csak enyhe hőmérsékletfüggést mutat. Ez azt jelenti, hogy a vizsgált hőmérsékleteken a kölcsönhatások erőssége elhanyagolható mértékben változik, ami a kalorimetriás mérések szempontjából előnyös, mert a kismolekulák disszociációja nem befolyásolja az eredményeket magas hőmérsékleten sem. Ebben a hőmérséklettartományban a reagensek legalább 99,99%-ban a HSA-hoz kötött formában vannak jelen. Számításaink szerint a HSA erősebb másodlagos kölcsönhatást alakít ki a MTX-tal, mint fotodegradációs termékeivel.

Differenciál pásztázó kalorimetriás módszerrel vizsgáltuk a HSA hődenaturációját csak HSA-t, HSA-t és MTX-ot, illetve HSA-t és a MTX fotodegradációs termékeit tartalmazó mintákban, különböző felfűtési sebességek mellett (0,5 K/min, 0,8 K/min, 1 K/min, 1,2 K/min). A termogramokon minden esetben két csúcs volt látható, melyek közül az adatok kiértékelése során az elsőt vettük figyelembe, mert az ad információt a MTX-ot kötő HSA-domén denaturációjáról. A Kissinger-függvények ábrázolásakor az egyenesek jól illeszkedtek az adatpontokra ($R^2 > 0,900$), így arra következtettünk, hogy (mivel a HSA denaturációja elsőrendű kinetika szerint játszódik le) a Kissinger-módszer megfelelő az E_a meghatározásához.

Számításaink alapján a MTX is jelentősen növeli az E_a -t, azonban a MTX fotodegradációs termékei több mint kétszeresére növelték a vizsgált paraméter értékét. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy ezek a vegyületek növelik a HSA stabilitását. A denaturálódott fehérjék gyulladáscsökkentő mediátorként viselkednek, így a fehérjestabilizáló hatású vegyületek sokszor gyulladáscsökkentő hatással is bírnak, például a nemszteroid gyulladáscsökkentő hatóanyagokkal kapcsolatban is leírták a fehérjestabilizáló hatást. A MTX is gyulladáscsökkentő (reumaellenes) hatóanyag, így azt feltételezzük, hogy hatásának kifejtésében a számos, eddig felderített mechanizmus mellett a fehérjestabilizálás is szerepet játszhat.

4.2. MTX és PHX kavitandszármazékokkal való kölcsönhatása

A szakirodalomban elsőként vizsgáltuk a MTX kölcsönhatását egy kavitandszármazékkal. A MTX-TAC komplexek kötési állandóinak meghatározásához szükséges fluorimetriás méréseket 390 nm-es gerjesztési hullámhossz alkalmazásával vettük fel. Az emissziós spektrumokat állandó MTX (10 μ M) és változó TAC

koncentráció mellett (0-80 μM), 293,15, 296,48, 299,82, 303,15, 306,48, 309,82 és 313,15 K hőmérsékleteken regisztráltuk. Az oldószer DMSO volt.

Az 540 nm-es emissziós hullámhosszhoz tartozó intenzitásértékeket használtuk a Benesi-Hildebrand egyenlettel történő számításokhoz, így megkaptuk a különböző hőmérsékletekre vonatkozó kötési állandókat. Az eredmények alapján a TAC stabil komplexeket képez MTX-tal. A kötési állandók meghatározását követően ábrázoltuk a kölcsönhatás van 't Hoff függvényét, mely nem egy, hanem két egyenesből áll, ami azt jelenti, hogy a komplexképződés mechanizmusa a hőmérséklettől függően eltérő lehet a vizsgált hőmérséklettartományon belül. A HyperChem szoftver alkalmazásával számítógépes modellezéssel is vizsgáltuk a komplexképződést. A modellezés eredményei alapján a komplexeknek kétféle (nyitott, illetve zárt) formája jöhet létre. Az alacsonyabb hőmérsékleteken az entrópiánövekedés entalpiánövekedéssel jár, míg a magasabb hőmérsékleteken entrópia- és entalpiacsökkenés történik. Ennek oka, hogy a vizsgált hőmérséklettartomány alacsonyabb hőmérsékletű régiójában (293,00-299,67 K) a TAC zárt konformációt vesz fel, így a MTX elsősorban a befogadó molekula etizteron-csoporttal rendelkező karjaival lép kölcsönhatásba. Ezzel szemben a magasabb hőmérsékletű régióban (303,00-313,00 K) a TAC nyitott konformációban van, az etizteron karok egymástól távol helyezkednek el, így a MTX és a befogadó molekula merev, aromás gyűrűi (a befogadó molekula ürege) között alakul ki kölcsönhatás.

A zárt konformáció kialakulása során tapasztalt entrópiánövekedés hátterében a MTX, illetve a TAC szolvátburkának elvesztése áll, de ez energiaigényes folyamat, amit az entalpia fedez. Emiatt a bruttó folyamatban pozitív előjelű entalpiaváltozást tapasztalunk. Ugyanakkor a nyílt konformáció esetében a kavitand alapvázának és a MTX molekulának merevebbé válása jelentős entrópiacsökkenést eredményez, az ugyancsak jelentős entalpiacsökkenés pedig az egymáshoz jól illeszkedő reaktánsok erős kölcsönhatásának következménye.

A PHX viszonylag új molekula, így a szakirodalomban elsőként írtuk le, hogy kölcsönhatásba léphet makrociklusos komplexképző molekulákkal. Mindkét izomerének (*transz*- és *cisz*-PHX) interakcióját vizsgáltuk kétféle kavitandszármazékkal, a TAC-dal és a TDC-dal.

Ahhoz, hogy vizsgálni tudjuk a PHX mindkét izomerét, először meg kellett győződnünk arról, hogy a stabilabb *transz* izomert át tudjuk alakítani az instabil (de farmakológiailag hatásos) *cisz* izomerré. Ennek érdekében a mintát UV-lámpával 366 nm hullámhosszúságú fénnel világítottuk be. A bevilágítás közben percenként regisztráltuk

az abszorpciós spektrumokat. Az eredményeink alapján kb. 15 perc UV-expozíció volt szükséges a teljes izomerizációhoz.

A PHX izomereinek 370 nm körül van abszorpciós csúcsa (a *transz* → *cisz* átalakulás során kismértékű hipszokrórom eltolódás figyelhető meg). A kavitandszármazékok ugyanezen hullámhossz környékén sokkal kisebb mértékben nyelnek el, ezért a fluorimetriás vizsgálatok során 366 nm-es gerjesztési hullámhosszt alkalmaztunk. A fluorimetriás méréseket állandó *transz*-, illetve *cisz*-PHX-koncentráció (50 µM), és változó TAC-, illetve TDC-koncentráció (0-450 µM) mellett végeztük, 293 K, 298 K, 303 K és 308 K hőmérsékleteken. A különböző komplexek kötési állandóinak meghatározásához a Benesi-Hildebrand egyenletet alkalmaztuk, melyhez a 490 nm-es emissziós csúcs intenzitásértékeit használtuk fel.

A kötési állandók ismeretében a van 't Hoff egyenletet alkalmazva meghatároztuk a komplexek képződésének termodinamikai paramétereit. Ábrázoltuk a kölcsönhatások van 't Hoff függvényeit is, melyek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a kétféle kavitandszármazék eltérő mechanizmussal komplexálja a PHX izomereit.

Ezen komplexek kialakulását is vizsgáltuk számítógépes modellezéssel, a HyperChem szoftver segítségével. Az elméleti modellezés segítségével szintén meghatároztuk a komplexek képződésének termodinamikai paramétereit. A számított adatok alátámasztották azt a fluorimetriás mérések alapján alkotott feltételezésünket, hogy a különböző kavitandók eltérő mechanizmussal komplexálják a PHX izomereit. Ennek hátterében a kavitandók szerkezete közti különbség áll.

A TAC esetében energiabefektetés (entalpiánövekedés) szükséges az etiszteron karok „kinyitásához”, a vendég molekula csak így tud az aromás szerkezetű üreggel kölcsönhatásba lépni. Az entrópiánövekedést a PHX és TAC szolvátburkának elvesztése (és az ezáltal „felszabaduló” oldószermolekulák) okozzák. A TDC alapváza azonban jelentősen kisebb funkciós csoportokkal (1,3-dikarboxiláto-5-fenoxi) rendelkezik, melyek mozgása sokkal kisebb energiát igényel, szolvátburkának elvesztése pedig kisebb entrópiánövekedéssel jár. A komplexképződés eredményeképpen merevebbé váló befogadó és vendég molekulák már nettó entrópiacsökkenést okoznak.

4.3. Xantin-oxidáz (XO) esszé hipoxantin (HX) szubsztráttal

EPR spektroszkópiás módszerrel, XO esszé alkalmazásával hasonlítottuk össze a MTX, *transz*-PHX és *cisz*-PHX szuperoxid gyökfogó tulajdonságait. Az EPR jelek

amplitudóinak átlagait ábrázoltuk az idő függvényében, majd az így kapott adatpontokra illesztett görbék segítségével meghatároztuk a reakciósebességi együtthatókat (k), melyek így az egyes mintákban a szuperoxid gyökök termelődésének sebességéről adnak információt.

A szabadgyöktermelés sebessége fontos adat, mert ha az élő rendszerekben ez a sebesség eléri a biológiai gyökfogó rendszerek (pl. szuperoxid-dizmutáz, kataláz, glutation-peroxidáz) teljesítőképességének határát, akkor a sejtek oxidatív stressznek vannak kitéve.

Eredményeink alapján mindhárom vizsgált anyagra jellemző, hogy minél nagyobb koncentrációban voltak jelen a mintákban, annál nagyobb mértékben csökkentették a gyöktermelés sebességét. A vizsgált vegyületek közül a *transz*-PHX minden alkalmazott koncentrációban nagyobb mértékben csökkentette a gyöktermelés sebességét, mint a *cisz*-PHX vagy a MTX. Ez az eredmény különösen érdekes, ha figyelembe vesszük, hogy a citotoxikus hatás szempontjából a *cisz*-PHX az aktív izomer, ebben a vizsgálatban (gyökfogó hatás szempontjából) mégis a *transz*-PHX bizonyult hatásosabbnak. A legalacsonyabb alkalmazott koncentráció esetében a *cisz*-PHX hatására nagyobb mértékben csökkent a gyöktermelés sebessége, mint a MTX hatására, azonban a többi koncentráción a MTX hatása kifejezettebb volt.

Kontroll méréseket is végeztünk, hogy bizonyítsuk, hogy ha csak a spincsapda van jelen a mintában, az önmagában nem ad EPR jelet, de jelenléte szükséges a jel kialakulásához. Ebből a célból csak N-hidroxi-TEMPOL-t, illetve csak XO-t és HX-t tartalmazó mintákat is mértünk. A kontrollok nem adtak kiértékelhető EPR jelet.

4.4. ABTS esszé

A korábban vizsgált vegyületek (MTX, *transz*-PHX és *cisz*-PHX) TEAC-értékeit ABTS esszé alkalmazásával határoztuk meg, spektrofotometriás módszerrel. Az azonos koncentrációjú ABTS^{•+}-t, illetve különböző koncentrációjú Troloxot, MTX-ot, *transz*-PHX-ot és *cisz*-PHX-ot tartalmazó minták abszorpcióját mértük 734 nm-en.

A PHX mindkét izomere esetében jelentősen nagyobb TEAC-értékeket kaptunk, mint a MTX esetében, azonban a *transz*- és *cisz*-PHX között nem volt szignifikáns különbség.

5. Összefoglalás

Eredményeink alapján a MTX és fotodegradációs termékei (DFP, ABGA) is fehérjestabilizáló hatással bírnak. Ezen hatásnak a jövőben akár terápiás jelentősége is lehet.

A MTX és PHX kavitandszármazékokkal való kölcsönhatásainak vizsgálata során megállapítottuk, hogy ezen komplexeknek különböző konformációik létezhetnek, melyek különböző termodinamikai paraméterekkel jellemezhetők. Ezek a vizsgálatok hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a jövőben a MTX-terápia célzottabbá váljon, ami a hatóanyag tolerálhatóságának jelentős növekedését eredményezheti.

A MTX és PHX antioxidáns tulajdonságainak összehasonlítása során arra a következtetésre jutottunk, hogy a *transz*-PHX jobb antioxidáns, mint a MTX, annak ellenére, hogy a MTX citotoxikus hatása a *transz*-PHX-ra nem jellemző. Ez az eredmény indokoltá tehet a *transz*-PHX lehetséges antireumatikus és kardioprotektív hatásának felderítése céljából végzett vizsgálatokat.

Az *in vitro* módszertan legfontosabb korlátja, hogy az általunk alkotott modell rendszerekben a molekulák nem ugyanabban a közegben vannak, mint az élő szervezetben, ezért természetesen a viselkedésük sem egyezik meg teljesen az *in vivo* vizsgálatokban megfigyelttel. Ennek ellenére az *in vitro* kutatások fontosak, hiszen ezeknek eredményei képezhetik a jövőbeli *in vivo* vizsgálatok alapját, illetve lehetővé teszik azok indokoltságának megállapítását is.

6. Új megállapítások

1. A MTX fotodegradációs termékei (DFP, ABGA) stabil kölcsönhatást alakítanak ki a HSA-val. Meghatároztuk a kölcsönhatás kötési állandóit.
2. A MTX és fotodegradációs termékei is növelik a HSA hődenaturációjának aktiválási energiáját, tehát stabilizálják a fehérjét. Ez a hatás kifejezettebb a fotodegradációs termékek esetében.
3. A MTX stabil komplexeket képez TAC-dal. A komplexek kötési állandóinak különböző hőmérsékleteken való meghatározása alapján alacsonyabb és magasabb hőmérsékleteken a komplexképződés eltérő mechanizmussal történik.
4. A PHX mindkét izomere stabil komplexeket képez TAC és TDC kavitandszármazékokkal. A komplexek kötési állandóinak különböző hőmérsékleteken való meghatározása alapján a különböző kavitandszármazékok eltérő mechanizmussal képeznek komplexeket a PHX-tal.
5. A MTX, *transz*-PHX és *cisz*-PHX antioxidáns tulajdonságainak meghatározása alapján a *transz*-PHX kifejezettebb antioxidáns hatással rendelkezik, mint a MTX.

7. Saját közlemények listája

7.1. Az értekezés alapjául szolgáló folyóiratcikkek

Zsolt Preisz, Zoltán Nagymihály, Beáta Lemli, László Kollár, Sándor Kunsági-Máté. Weak Interaction of the Antimetabolite Drug Methotrexate with a Cavitand Derivative. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21, 4345. [IF: 5,923; Q1]

Zsolt Preisz, Sándor Kunsági-Máté. Effect of methotrexate and its photodegradation products on the temperature induced denaturation of human serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2021**, 245, 118905. [IF: 4,098; Q2]

Zsolt Preisz, Nóra Hartvig, Balázs Bognár, Tamás Kálai, Sándor Kunsági-Máté. Comparative EPR Study on the Scavenging Effect of Methotrexate with the Isomers of Its Photoswitchable Derivative. *Pharmaceuticals* **2021**, 14, 665. [IF: 5,863; Q1]

Zsolt Preisz, Zoltán Nagymihály, László Kollár, Tamás Kálai, Sándor Kunsági-Máté. Weak Interactions of the Isomers of Phototrexate and Two Cavitand Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22, 10764. [IF: 5,923; Q1]

Az értekezés alapjául szolgáló cikkek összesített impakt faktora: 21,807

7.2. Az értekezés alapjául szolgáló konferencia-előadások és poszter prezentációk

Preisz Zsolt. A metotrexát és fotodegradációs termékeinek hatása a humán szérum albumin hődenaturációjára. **XXIV. Tavaszi Szél Konferencia** (Miskolc, Magyarország, 2021. 05. 28-29.; előadás).

Zsolt Preisz, Balázs Bognár, Tamás Kálai, László Kollár, Sándor Kunsági-Máté. Some Interactions of the Novel Photoswitchable Compound Phototrexate. **DDRS2021 Conference** (Budapest, Magyarország, 2021. 11. 15-17.; poszter).

7.3. Egyéb folyóiratcikkek

Anita Bufa, Nelli Farkas, **Zsolt Preisz**, Viktória Poór, Csilla Páger, Sándor Szukits, Bálint Farkas, Péter Miklós Gőcze. Diagnostic relevance of urinary steroid profiles on ovarian granulosa cell tumors: two case reports. *Journal of Medical Case Reports*, **2017**, 11, 166. [IF: 0,885; Q3]

Kumulatív impakt faktor: 22,692

7.4. Egyéb konferencia-előadások és poszter prezentációk

Zsolt Preisz, Ferenc Kilár, Péter Miklós Gőcze, Nelli Farkas, Anita Bufa. Urinary steroid profiles of a woman with recurrent granulosa cell tumour of ovary. **MLDT 58. Nagygyűlése** (Szeged, Magyarország, 2016. 08. 25-27.; előadás).

Preisz Zsolt. Vizeletszteroid-profilok vizsgálata granulózasejtes petefészek daganatnál. **III. Cholnoky László Nemzetközi Szakkollégiumi Szimpózium** (Pécs, Magyarország, 2017. 05. 11-12.; előadás).

Zsolt Preisz, Ferenc Kilár, Péter Miklós Gőcze, Nelli Farkas, Anita Bufa. Urinary steroid profiles of women with granulosa cell tumour of ovary. **MLDT 59. Nagygyűlése** (Pécs, Magyarország, 2018. 08. 30-09. 01.; poszter).

7.5. Szerkesztői tevékenység

Luca Fanni Kajos, Cintia Bali, **Zsolt Preisz**, Petra Polgár. Adrienn Glázer-Kniesz, Ádám Tislér, Rebeka Szabó. 10. Jubileumi Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia 2021 Absztraktkötet; 10th Jubilee Interdisciplinary Doctoral Conference 2021 Book of Abstracts. Pécs, Magyarország: Pécsi Tudományegyetem Doktorandusz Önkormányzat (2021) 347 p. ISBN: 9789634298205.

Luca Fanni Kajos, Cintia Bali, **Zsolt Preisz**, Rebeka Szabó. X. Jubileumi Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia 2021 Tanulmánykötet; 10th Jubilee Interdisciplinary Doctoral Conference 2021 Conference Book. Pécs, Magyarország: Pécsi Tudományegyetem Doktorandusz Önkormányzat (2022) 872 p. ISBN: 9789634298199.

8. Köszönetnyilvánítás

A kutatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal finanszírozta a Pécsi Tudományegyetem TKP2021-EGA-17 című projektje, illetve a 2019-2.1.11-TÉT-2019-00042 pályázat keretében.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kunsági-Máté Sándornak, aki nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre. Nagyon hálás vagyok szakmai iránymutatásáért és támogatásáért.

Köszönet illeti Prof. Kálai Tamást és Prof. Lente Gábort, amiért biztosították a kutatásunkhoz szükséges eszközöket és műszereket.

Köszönöm Prof. Kollár Lászlónak és Dr. Nagymihály Zoltánnak az általuk előállított kavitandokat. Köszönöm Prof. Kálai Tamásnak, Dr. Hegedűs Lászlónak és Dr. Jekő Józsefnek a PHX szintetizálását. Köszönettel tartozom Dr. Hartvig Nórának és Dr. Bognár Balázsnak az antioxidáns tulajdonságok mérésében nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti hallgatótársaimat, Derdák Diánát és Kovács Ferencet a sok biztatásért, amit tőlük kaptam.

Szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak az évek során nyújtott folyamatos támogatást és lelkesítést.